

分析化学総説

化学発光計測を利用する分析法

中島 憲一郎*

Analytical methods utilizing a chemiluminescence measurement (Review)

Kenichiro NAKASHIMA*

*Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagasaki University, 1-14, Bunkyo-machi, Nagasaki 852-8521

(Received 11 December 1999)

Chemiluminescence (CL) is the emission of light as the result of electronic excitation of the luminescing species by a chemical reaction of a precursor of that species. Many CL mechanisms have been studied and utilized to analyze either the chemiluminogen or other compounds that participate in the CL reaction. Generally, the CL detection methods are known to be highly sensitive and selective. Thus, various kinds of CL reagents, such as luminols, acridinium esters, aryloxalates, dioxetanes, and $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$, have been developed and their properties as chemiluminogens examined. Enhancement of the CL reactions has also been examined, and several substances such as 4-iodophenol for luminol-peroxidase-hydrogen peroxide CL, pyrimido[5,4-*d*]pyrimidines for peroxyoxalate CL and quinine for cerium(IV) CL were found to be useful for this aim. During the last couple of decades, many procedures utilizing CL detection have been developed for determining trace amounts of organic and inorganic compounds, including some of which are biologically important. Among the methods, HPLC or immunoassay with CL detection is more popular and applicable in such fields as clinical and environmental chemistry. Various compounds of biological importance have been determined as diagnosis markers. More recently, capillary electrophoresis with CL detection has become a preferred tool for the analysis of biological samples available in small quantities. In this paper, the application and usage of CL detection in a variety of instrumental analyses, with special emphasis on HPLC, is discussed.

Keywords : chemiluminescence; chemiluminescent reagents; mechanism of chemiluminescence; fluorescent labeling reagent; HPLC.

1 はじめに

化合物を特定し、その存在量を明らかにするために生まれてきた分析化学の技術は、20世紀後半の急速な経済成長や、エレクトロニクスに代表される近代科学の発達に支えられて、大きな変貌を遂げてきた。マクロからセミミクロ、ミクロ、更にはウルトラミクロへと分析対象物の微量化が進むとともに、分析方法の高感度化が図られ、現在ではzeptomol (10^{-21} mol) やyoktomol (10^{-23} mol) レベルの検出が可能な超高感度分析法が出現するに至っている。化学発光 (chemiluminescence) 計測法も、このような背景の中で創案され、現在、超高感度な分析法の一つと

して主に高速液体クロマトグラフィー (HPLC) やイムノアッセイなどの検出系に利用されている。本稿では、化学発光の歴史について簡単に触れるとともに、代表的な発光反応の機構や特性を概説し、化学発光計測を利用する分析法についてフロー分析法への応用研究を中心に詳述したい。なお、化学発光計測に関しては、多くの著書^{1)~4)}や総説^{5)~8)}があるので参考にさせていただきたい。

2 化学発光計測

2.1 化学発光研究の歴史

化学発光を分析化学的に利用するための基礎となった化学発光研究の歴史について、まず簡単に触れてみたい。化学発光は化学反応により分子が励起されて励起状態とな

* 長崎大学大学院薬学研究科: 852-8521 長崎市文教町 1-14

り、そこから基底状態に戻る際に光を放つ現象である。ホタルや微生物が生み出す化学発光は生物発光 (bioluminescence) であり、酵素やアデノシン-5 三リン酸 (ATP) などが反応に関与する。1877 年、Radziszewski はロフィン (2,4,5-トリフェニルイミダゾール) の発光を観測した⁹⁾。それまで、化学発光現象自体は知られていたが、合成有機化合物の化学発光としてはロフィンが初めての例である。半世紀後の 1928 年には、Albrecht がルミノール (5-アミノ-2,3-ジヒドロ-1,4-フタラジンジオン) を合成し、その発光を観測した¹⁰⁾。ルミノールの発光反応を鉄イオンやオゾンなどが触媒して増感することから、鑑識化学における血痕の判定、大気中のオゾンや窒素酸化物 (NO_x) の測定などに利用されている。また、Thorpe ら¹¹⁾ (1985) により見いだされた、フェノール化合物によるペルオキシダーゼ-ルミノール系の発光増感は、高感度な化学発光イムノアッセイに応用されており、70 年を経た現在でもルミノールは非常によく利用されている。当然のことながら、これまでに数多くのルミノール誘導体が合成され、化学発光誘導体化試薬としての利用や増感剤との併用による高感度分析への適用など、種々の化合物の化学発光分析に使用されている。したがって、ルミノールの出現によって、化学発光計測の分析化学への適用が始まったとも言えよう。1935 年には Glue と Petsch が¹²⁾、ルシゲニン (*N,N*-ジメチル-9,9'-ビアカリジニウム二硝酸) の化学発光を見いだした。ほとんどの化学発光反応は酸化反応であるが、ルシゲニンの化学発光は還元物質でも生じることが示された。さて、これらの発光反応では反応する化合物自身が発光体であるが、化学反応で生じる高エネルギー状態の反応中間体が、そのエネルギーを共存する蛍光物質に与えて励起状態とし、それが基底状態に戻る際に発光を生じる系が見いだされた。Chandross¹³⁾ (1963) や Rauhut ら¹⁴⁾ (1965) により研究されたもので、過シュウ酸エステル化学発光 (peroxyoxalate chemiluminescence, PO-CL) と呼ばれている。蛍光物質、過酸化水素及びそれを生じる酵素反応の基質や酵素活性の分析などには用いられている。化学発光の収率はホタルの生物発光収率 ($\Phi = 0.88$) に比べると非常に小さく、ルミノールでも $\Phi = 0.01 \sim 0.015$ である。なお、PO-CL では $\Phi = 0.05 \sim 0.34$ の高収率な系が見いだされ、ケミカルライトなどの光源として利用されている。その後、Kopecky ら¹⁵⁾ (1968) や Richardson ら¹⁶⁾ (1972) により研究されたジオキセタン類の発光は、20 年後には超高感度なイムノアッセイ用化学発光試薬、アダマンチルジオキセタン誘導体の開発につながり、Schaap ら¹⁷⁾ (1987) や Bronstein ら¹⁸⁾ (1989) により酵素活性測定あるいは DNA 検出の研究へと展開された。そのほか、テトラキス(ジメチルアミノ)エチレン、インドール誘導体、シッフ塩基などの発光体が見いだされている。これらは、酸

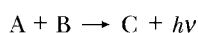
素分析やイムノアッセイなど、特徴的な分析研究に利用されているものの応用例は非常に少ない。また、ユニークな発光系として、アデニンやグアニンとグリオキサールの発光反応、電気化学発光 (electrogenerated chemiluminescence, ECL) の一つであるルテニウム錯体の化学発光などが見いだされている。前者は DNA の分析研究などに、後者は三級アミンなどの定量に利用されている。

一方、発光反応機構に関する研究も精力的に行われてきた。McCapra¹⁹⁾ (1968) はジオキセタン中間体を經由する発光反応機構を解明し、Koo と Schuster (1977) は²⁰⁾ジフェノイルペルオキシドの発光を研究して、CIEEL (chemically initiated electron exchange luminescence) 機構を提唱した。また、Rubinstein ら²¹⁾ (1983) はルテニウムのビピリジル錯体の化学発光機構を明らかにしている。これらの発光機構の解明は、発光反応系を分析的に利用していく上で重要な示唆を与えている。PO-CL の反応中間体は、非常に不安定なため完全には同定されていないが、¹⁹F-NMR による研究で、ヒドロペルオキシオキサレートがその一つであると提案されている²²⁾。

化学発光計測を利用する分析法を、Chemical Abstracts の検索で調べた結果、1967～1998 年の間に、Chemiluminescence 17355 件、Chemiluminescence + Analysis 5331 件、Chemiluminescence + Determination 1861 件、Chemiluminescence + HPLC 599 件であった。化学発光に関する分析化学的な研究が広範囲に行われていることを示している。化学発光を利用する計測法が登場して約 30 年、HPLC の手段に使用されて約 20 年が経過しているが、International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence など化学発光に関する幾つかの国際シンポジウムも過去 10 年間に充実・発展を遂げている。また、国内では「生物発光化学発光研究会」が結成され、これまで既に 18 回の学術講演会が開催されている。化学発光計測は生物発光計測とともに高感度で高選択的な方法として今後ますます重要になるものと期待される。

2・2 化学発光計測の原理

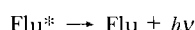
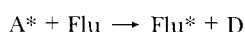
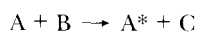
化学発光を利用して計測する原理はどのように考えればよいであろうか。まず、発光反応には通常、1) 反応の基質となる化合物がそのまま発光体となる場合、2) 反応によって生じる励起状態の化合物がそのエネルギーを共存する蛍光物質に与え、その蛍光物質からの発光が得られる場合、の二通りが考えられる。ここで、1) の反応式は次のように表すことができる：



この場合、生じる発光量 ($h\nu$) が基質 A (発光試薬) 及び

B (酸化剤) の濃度に比例するため、発光量を測定することにより、A 又は B を定量することができる。また、この反応がある物質 (触媒など) により増感され、発光量がその濃度に比例する場合は、それらの濃度を定量することもできる。本反応では、基質 B はほとんどの場合酸化剤であるが、A がルシゲニンの場合、B として還元性の物質も利用できる。

2) の反応は次式で示される:



ここで生じる発光量 ($h\nu$) は基質 A, B 及び共存する蛍光物質 (Flu) の濃度に比例する。したがって、発光量を測定することにより、これらの定量が可能となる。PO-CL 反応に代表されるこの反応は、蛍光物質の分析に特に有用である。

また、1), 2) いずれの反応においても、基質 B として有力な酸化剤の一つである過酸化水素を利用する場合には、これを生じさせるような酵素反応を連関させることにより、酸化酵素の活性やその基質濃度を測定することができる。すなわち、化学発光を利用する計測法は、反応を生じさせるのに必要なあらゆる化合物を測定することが可能な非常に幅広い分析法と言える。事実、化学発光反応はバッチ法だけでなく HPLC、フローインジェクション分析 (FIA)、写真法、キャピラリー電気泳動法 (CE) など実に様々な測定法の検出手段として利用されており、その応用性の実証されている。中でも、高感度 HPLC 分析の検出手段として有力な方法の一つであり²³⁾、蛍光あるいは化学発光誘導体試薬の開発²⁴⁾²⁵⁾と相まって、近年、急速な広がりを見せている。

2.3 化学発光検出の特徴

蛍光法がキセノンランプなど、光源からの光エネルギーによって分子を励起するのに対して、化学発光法では化学反応により励起状態の分子を生じさせる。化学発光法で利用する発光は大部分が可視部の発光であり、分子が発光する状態の励起エネルギーは 72 kcal/mol 以下である。したがって、化学発光法では励起光源が不要であり、光源に由来する迷光や光源の変動が原因で生じるノイズレベルの上昇や変動がなく、検出器の感度を上げることができる。しかし、一方では、使用する溶媒や試薬中の不純物に由来する発光が障害となることも多い。したがって、有機溶媒や試薬は十分に精製したものを使用する必要がある。また、HPLC の場合は溶離液の送液装置以外にポストカラム化学発光反応試薬の送液装置が必ず必要であり、蛍光検出法に

比べ装置が複雑となることや、ポストカラム法であるため分析コストが高くなる場合も多い。

2.4 化学発光の検出システム

生じた化学発光を検出する方法は、至って単純である。暗闇の中で生じる発光を光電子増倍管で捕らえ、電気信号に変換する装置を利用すれば良い。感度を上げるには、高感度な光電子増倍管が必要である。バッチ (用手) 法、フロー法及び写真法における検出を以下に概説する。

1) バッチ法 通常、測定装置内に設置された小試験管やウエル中に、試料及び試薬を手動あるいは自動で順次注入する。生じる発光は光電子増倍管で検出し、出力を増幅器で増幅後、カウントする。各試料の単位時間当りの発光量 (カウント数) を測定し、検量線法で定量する。光電子計数撮像により微弱発光の画像化を行うこともできる²⁶⁾。バッチ法は化学発光イムノアッセイに繁用されている。イムノアッセイ用の発光分析装置は数多く開発されているが、化学発光法の迅速な反応性やダイナミックレンジの広さなどを特長として、ますます増加の傾向にある。例えば、検体の処理速度は 100~200 テスト/時と迅速であり、しゅよう (腫瘍) マーカーなどの臨床検査に不可欠な装置となっている²⁷⁾。

2) フロー法 暗箱中にはテフロン製のチューブを渦状に巻いたセル、あるいはステンレス円盤に渦状に溝を作りそれに石英板を重ね合わせたセル (60~120 μl) と、これらのセルと対面するように設置された光電子増倍管がセットされている。FIA あるいは HPLC の送液ポンプから送液されたキャリアー液あるいは溶離液に試料を注入し、FIA の場合はそのまま、HPLC の場合はカラム分離後、別の送液ポンプから送られてきた発光試薬とセルの直前で混合させ、生じる発光を検出し、電気信号に変換後、シグナルをチャート上に記録する。溶離液 (あるいはキャリアー液) や発光試薬の送液速度、液性、反応温度、セルへの到達時間、などを検討して、最適な条件を見いだす。送液速度は、セルの耐圧 (< 10 kg/cm²) を考慮して設定されなければならない。なお、本システムでは総発光を検出し分光は行わないが、特殊な分光フィルターを利用して選択性の向上を図ることもできる。

HPLC 法を利用する場合、Fig. 1 に示すような幾つかのフローシステムを用いることができる。システム A は最もシンプルなもので、ポストカラム試薬を単一溶液として送液する場合に適用する。例えば、PO-CL 法で、分離された過酸化水素の検出にポストカラム試薬としてアリールシユウ酸エステルと蛍光物質の混合液が使用されるときや、分離された蛍光物質の検出にアリールシユウ酸エステルと過酸化水素の混液をポストカラム試薬として用いる場合などに使用する。システム B は最も繁用されているシ

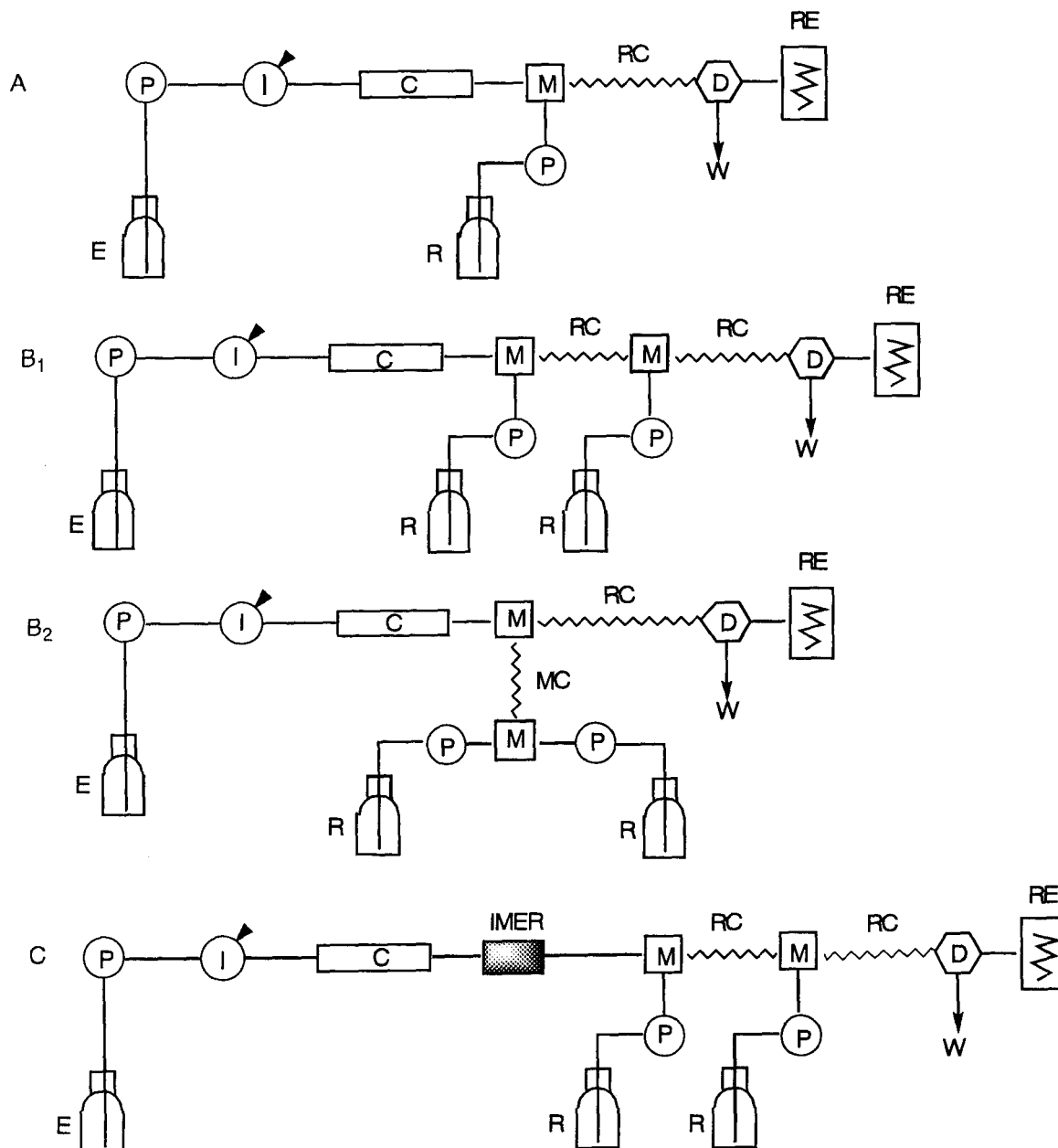


Fig. 1 CL detection systems in combination with HPLC

P: pump; I: injector; C: column; M: T-joint; D: detector; RC: reaction coil; MC: mixing coil; IMER: immobilized enzyme reactor; RE: recorder; E: eluent; R: post column reagent; W: waste

(Reproduced from ref. 23: *Bunseki*, 518 (1996) with permission from the Japan Society for Analytical Chemistry)

システムである。ポストカラム試薬を送液する方法に、二通りがある。一方は、分離された各成分と発光試薬を順次反応させて発光させるものであり (B₁)、他方はそれぞれの発光試薬を混合した後に、カラム分離された試料成分と混合、発光させるもの (B₂) である。後者は、発光試薬と混合する前に、溶離液の pH、有機溶媒含量などを発光に最適な条件に設定する必要がある場合に適している。システム C は、固定化酵素リアクター (immobilized enzyme

reactor, IMER) を使用して、カラム分離後の成分を過酸化水素に変換、発光させるものである。このシステムでは酵素反応を利用するため、溶離液には緩衝液を、カラムにはイオン交換カラムを利用することが望ましい。

これら以外にも、ゼロデッドボリュームで発光反応を検出するように工夫した検出装置を用いて、試薬と分析対象物間の高速な発光反応を容易に測定できるようにしたシステム²⁸⁾や、グラジエント溶出を用いるシステムなども考え

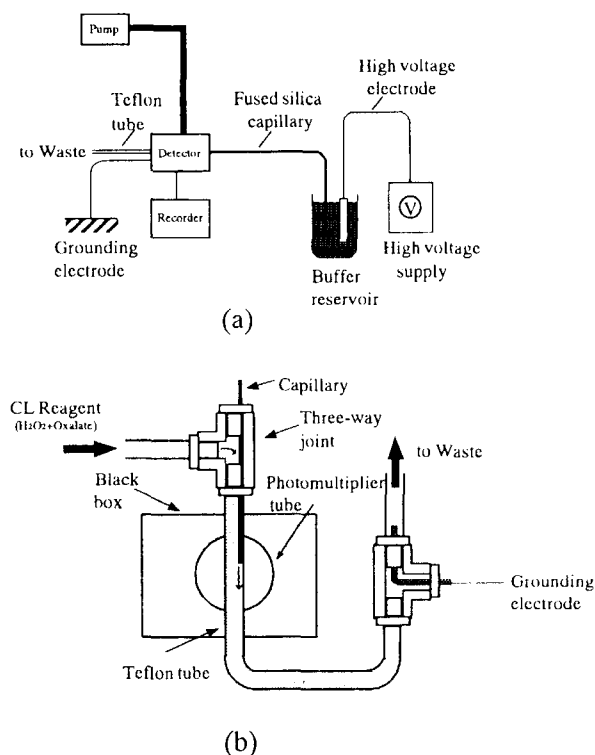


Fig. 2 Capillary zone electrophoresis-CL detection system

(a) Schematic diagram of the apparatus, and (b) the CL detector

(Reproduced from ref. 31: *Anal. Sci.*, **10**, 223 (1994) with permission from the Japan Society for Analytical Chemistry)

られているが、装置の複雑化やコストの面からできるだけ単純なシステムが望ましい。また、ポストカラムで発光試薬を混和する回数が増えると、希釈される回数が増加する結果、検出感度の低下につながることや、試薬溶液の混合効率が検出感度に影響を与えることなども考慮しなければならない²⁹⁾。

FIA の場合は、以上のシステムから分離カラムを取り除けばそのまま利用することができる。

CE の検出に CL を利用するための試みがなされている。検出セルでキャピラリーからの泳動液と発光試薬を混合し、生じる発光を光ファイバーを装着した検出系³⁰⁾あるいは光電子増倍管 (Fig. 2)³¹⁾ で検出する (オンライン方式)。キャピラリーカラムの一端からの泳動液を発光試薬の入ったリザーバーに導入し、生じる発光を光ファイバーを利用して検出するオフライン方式も考案されている³²⁾。

3) 写真法 ポラロイドカメラなど、インスタントカメラのフィルムホルダーとフィルムを利用して検出する。フィルムはモノクロ、カラーいずれも利用できる。暗室で、タイタープレートのウエルやビニリデンクロリド製などのフッドラッピングフィルム、あるいはアガロースゲル

の上で発光試薬を混和し、生じた発光を一定時間フィルムに感光させ、スポットとして検出する。市販の検出装置を利用すれば明所でも測定することができる。得られたスポットの大きさから半定量することもできる。また、化学発光イムノアッセイや DNA プローブの検出などでは、X 線フィルムが利用されている。

その他、最近では電荷結合素子 (CCD) カメラを利用して、発光状態を動的に視覚化して捕らえる方法が増加している。生体や細胞で生じる様々な変化がリアルタイムで計測できるため、非常に多くの情報が得られる。生理化学、細胞学あるいは遺伝子工学などの分野で、これからますます重要になる計測技術であろうと考える。

3 化学発光物質と発光反応

ここで、化学発光計測に利用されている発光物質の反応機構について簡単に触れてみたい。有機化学発光物質で、その反応が分析手段として利用されているものは意外と少なく、ルミノール、ルシゲニン、アクリジン、ロフィン、インドールの各誘導体などである。

ルミノールは塩基性の溶液中、一重項酸素によりジアザキノン中間体を経てペルオキシドとなり、これが開裂して励起状態のフタル酸イオンが生じ、これから基底状態に戻る際に発光すると考えられている。この反応は、鉄錯体、ヘモグロビン、ヘミン、オゾン、ハロゲン、酵素など、種々の物質で触媒される。

硝酸塩のルシゲニンは水溶性であり、ほかの発光物質に比べ分析試薬としての利用度が高い。主な発光機構として塩基性溶液中、過酸化水素によりペルオキシドを形成し、これが開裂する際に励起状態の *N*-メチルアクリドンを生じ、これが基底状態に戻る際に発光が生じると考えられている。ルシゲニンは還元性物質の糖などでも発光する。例えば、還元糖を過ヨウ素酸で酸化すると、 α -ヒドロキシカルボニル基を有する生成物が生じるが、これとルシゲニンが反応して発光すると考えられている。また、アクリジン誘導体であるアクリジウムエステルはルシゲニン同様、ジオキセタン構造を経て励起状態の *N*-メチルアクリドンを生じ、発光すると考えられている。

ロフィンは塩基性下、一重項酸素によりヒドロペルオキシドを形成し、ジオキセタン構造を経て励起状態のジアロイルアミジンとなり、これが発光 (黄色発光, 530 nm) すると考えられている。ロフィンの化学発光は古くから知られているにもかかわらず、ロフィン誘導体の化学発光を利用する分析的な研究は非常に少ない。コバルトイオンなど、触媒反応による増感を利用した無機イオンの分析が行われている。

スカトール (3-メチルインドール) などのインドール誘導体は、ジメチルスルホキシド溶液中 ϵ -ブトキシドや水酸

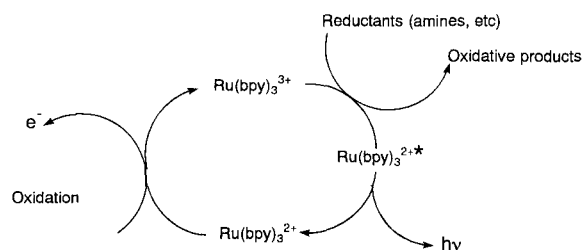
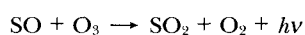


Fig. 3 ECL of $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$

化カリウムなどの塩基を加えると発光する。その発光機構としては、酸化により生じるヒドロペルオキシドがジオキセタン構造を経由する分解で励起状態となり、基底状態に戻る際に発光すると考えられている。インドール誘導体の分析的应用例は少ないが、 β -D-ガラクトシダーゼ (β -Gal) の発光基質として、インドキシル β -D-ガラクトース類が開発され、イムノアッセイに利用されている。

過シュウ酸エステル化学発光の場合は、トリエチルアミンなどの塩基性触媒存在化、アリールシュウ酸エステル (又はオキサミド) と過酸化水素の反応により生じた高エネルギー中間体 (置換ジオキセタン) と共存する蛍光物質間で電荷移動錯体を形成し、蛍光物質にエネルギーが移行する結果、蛍光物質が励起され、それからの発光が生じると考えられている。

無機化学発光では、オゾン発光が種々の分析法に利用されている。オゾンは強力な酸化剤であるが、大気汚染物質であるエチレンや一酸化窒素と反応して発光する。次式に示すように、オゾンとエチレンの反応では、ホルムアルデヒドとギ酸とともに発光が生じる。また、一酸化窒素とオゾンの反応では、二酸化窒素、酸素が生じると同時に発光が生じる。同様に一酸化硫黄とオゾンの反応でも、生成した励起状態の二酸化硫黄から発光が生じることが知られている。



ユニークな発光として、ルテニウム錯体の化学発光がある。ルテニウム (II) のビピリジル錯体、[トリス (2,2'-ビピリジル) ルテニウム (II), $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$] は安定に存在することができるが、Fig. 3 に示すように電極表面での電解酸化により、酸化電位が高く不安定な $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ となる。同時に溶液中に存在する第三アミン (NR_2) などの還元物質も、酸化還元反応によりラジカル体 (NR_2^\cdot) となる。次いで、 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ と NR_2^\cdot の反応により励起状態の $[\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}]^*$ が生じ、これが基底状態に戻る際に発光が

生じると考えられている。このルテニウム錯体の発光現象は ECL と呼ばれ、1977 年 Chang らにより最初に報告された。多環芳香族炭化水素や複素環式化合物の電解酸化でも観測される。なお、本発光反応系では、発光後もルテニウム錯体が消費されずに繰り返し使用できるため、発光体が消費されてしまうほかの化学発光に比べ感度の点で有利となる。ルテニウム錯体の ECL は HPLC の検出系やイムノアッセイへの利用が広がっており、実用的な計測法として今後の発展が注目される。

4 化学発光計測の分析化学的应用

これまでは化学発光計測の基礎について述べてきたが、以下、化学発光計測がどのような分析に利用されているか、各発光試薬ごとにその応用例を示してみたい。

4.1 ルミノール誘導体

4.1.1 ルミノールの化学発光試薬としての利用

ルミノールそのものが化学発光試薬としてよく利用されるのは、ルミノールの発光反応の触媒となる化合物を分析する場合である。例えば、コバルト (II)-ルミノール-過酸化水素の発光系が HPLC に初めて取り入れられた例として、蛍光や UV 検出では検出できなかった脂肪族アルコール、アルデヒド、エーテル、及び糖類など、酸素を含む化合物の分析を挙げることができる。これらの化合物は、アントラキノンジスルホネートによる増感光化学反応を利用して過酸化水素に変換後、本反応系で発光・検出する。検出下限は低 pg レベルである³³⁾。同じくコバルト (II) の触媒反応を利用して、米粉中のコバルトが精度良く測定されている。コバルト (II) を陽イオン交換カラムで分離後、HPLC 化学発光検出するもので、検出器に分光蛍光光度計を使用しているにもかかわらず、検出下限は 0.5 ng/l (3 σ) と高感度である³⁴⁾。銅イオンはルミノール-過酸化水素の発光反応を触媒する能力を有するが、タンパク質が存在するとその濃度に応じて発光を減少させる。この現象をうまく利用して、タンパク質の HPLC 定量ができる。この方法では、オブアルブミンの 50 ng が検出できている³⁵⁾。脂質酸化反応の生成物であるヒドロペルオキシド類は、順相系 HPLC で分離後、ルミノールとチトクローム *c* をポストカラム発光試薬として高選択的に検出・定量することができる³⁶⁾³⁷⁾。生体リン脂質であるホスファチジルコリン誘導体を順相系カラムで分離後、本反応系で検出・定量した結果、ヒト血しょう (漿) 中のヒドロペルオキシドは血漿 1 ml 中、28~431 pmol ヒドロペルオキシド-O₂ であった³⁸⁾。同じく、ヒト血漿中の低密度リポ蛋白質 (LDL) 中のホスファチジルコリンヒドロペルオキシドが定量され、健康人に比較して、アテローム性動脈硬化症や高脂質血症の患者はその濃度が高いことが示された³⁹⁾。更に、ヒ

トの皮膚表面が太陽光に暴露されるとスクワレンヒドロペルオキシドが生じることが本計測システムで確認され¹⁰⁾、続いて、ラット肝及び脳組織中のホスファチジルコリン及びホスファチジルエタノールアミンのヒドロペルオキシドが計測された¹¹⁾。一方、アテローム性動脈硬化症の病因論に脂質ヒドロペルオキシドの定量が重要であることから、ルミノール-ミクロペルオキシダーゼ発光系を用いて、FIA による迅速な LDL 中のペルオキシドの計測法が開発されている¹²⁾。食品中の脂質酸化の計測にも本反応系が利用され、バター及び乳製スプレッドのトリアシルグリセロール中の脂質酸化が貯蔵中に増加することが示された¹³⁾。ホスファチジルコリンとコレステリルエステルのヒドロペルオキシドを、カラムスイッチング HPLC により同時定量する方法が開発され、健康人血漿中の脂質ヒドロペルオキシドの測定に適用された。ホスファチジルコリン及びコレステリルエステルの各ヒドロペルオキシド濃度は、 36.0 ± 4.0 nM 及び 12.3 ± 3.1 nM であった¹¹⁾。一方、健康人赤血球膜中のコレステロールヒドロペルオキシドの測定にも本反応系が適用されている¹⁵⁾。最近、イソルミノールとミクロペルオキシダーゼを発光試薬に用いる、ブタの大動脈内皮細胞などの培養細胞中の脂質過酸化測定が検討され、*in vitro* で細胞の脂質酸化を直接測定できる方法が開発された¹⁶⁾。

4.1.2 ルミノールの過酸化水素及びそれを生じる酵素反応基質計測への利用とその応用 ところで、過酸化水素はルミノールの酸化反応試薬として優れており、その量が発光量に比例することから、過酸化水素の測定も可能となる。また、過酸化水素そのものが測定されているのは当然であるが、酵素反応の結果生じる過酸化水素を測定することにより、酵素活性や、反応の基質濃度の測定が可能となる。グルコースオキシダーゼ、コレステロールオキシダーゼあるいはキサンチンオキシダーゼなどによる過酸化水素の生成を利用してグルコース、コレステロール、キサンチン類の濃度測定を行ったり、種々の脱水素酵素（デヒドロゲナーゼ）により生成する還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド [NAD(P)H] と過酸化水素の生成を共役させることにより、関連基質や酵素活性を測定することができる。例えば、アデノシンはアデノシンデアミナーゼによりイノシンに変換され、これは更にヌクレオシドホスホリラーゼによりヒポキサンチンへと変換される。そこで、ヒポキサンチンやキサンチンがキサンチンオキシダーゼにより、過酸化水素と尿酸に変換され、ルミノール-ペルオキシダーゼ系で発光・定量することができることを利用して、これらプリン誘導体の全自動分析法が開発されている。迅速な方法であり、1日に200検体を処理することができる¹⁷⁾。更に、IMER をフロー系に組み込んで、オンラインで過酸化水素を発生させ、これを測定することで、

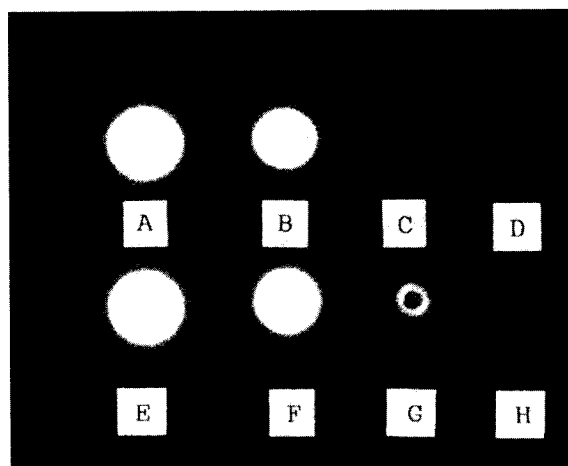


Fig. 4 Photographic detection of NAGase by LUM-NAG using POD as a catalyst

Upper spots (A ~ D) are with *p*-iodophenol added (0.1 mg). Amount of NAGase added: A and E, 50 m I.U.; B and F, 5 m I.U.; C and H, blank

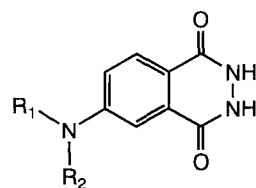
(Reproduced from ref. 50: *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 1323 (1990) with permission from Pharmaceutical Society of Japan)

間接的に酵素基質を定量する簡便な FIA-PO-CL 法が開発されている。固定化酵素は、アルキルアミン修飾ビーズなどにグルタルアルデヒド法などで酵素を共有結合させて調製する。酸化酵素は比較的安定であり、長期間の使用に耐えるものが多いが、酵素反応の至適条件や、発光反応の至適条件を十分に考慮して計測条件を設定しなければならない。グルコースオキシダーゼ及びウリカーゼを同時に固定化した IMER を利用して、血清中のグルコースや尿酸が定量できるが、1時間に60検体を処理することができ、用いる試料も微量で済む簡便で感度の良い方法である¹⁸⁾。 β -グルコシダーゼとグルコースオキシダーゼの IMER を利用する β -D-グルコシドの FIA 及び HPLC 定量法が検討された。フェニル- β -D-グルコシド、*p*-ニトロフェニル- β -D-グルコシド、サリシン- β -D-グルコシドはそれぞれ β -グルコシダーゼで β -D-グルコースに分解され、更にグルコースオキシダーゼで過酸化水素に分解される。これをルミノールで発光させ検出する。HPLC の溶離液に 30% アセトニトリルを含む緩衝液を用いているが、IMER の活性に大きな影響は見られなかった。本法の検出下限は 2 pmol である¹⁹⁾。

酵素活性測定用の化学発光基質として、*N*-アセチル- β -D-グルコサミンとルミノールの縮合物が開発された。*N*-アセチル- β -D-グルコサミニダーゼによりルミノールと *N*-アセチル- β -D-グルコサミンに分解し、ルミノールの発光を生じさせて酵素活性を測定する。検出には写真法を用いている (Fig. 4)⁵⁰⁾。

ところで、ルミノールの化学発光計測は、イムノアッセイ、DNA ハイブリダイゼーションアッセイなどにも利用されている⁵¹⁾⁵²⁾。例えば、グルコースオキシダーゼを標識酵素とする化学発光イムノアッセイでは、マイクロペルオキシダーゼとルミノールを発光物質として、腫瘍マーカーの α -フェトプロテインやフェリチンなど、甲状腺刺激ホルモン (TSH)、黄体形成ホルモン (LH) や卵胞刺激ホルモン (FSH) などが計測されている。標識物質にはアルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) などが使用される。現在、多くの化学発光イムノアッセイ測定装置が開発・市販され、腫瘍マーカー、ホルモン、感染症などが全自動で測定できるようになり、日常的な臨床検査に役立っている。なお、化学発光イムノアッセイ測定装置の開発は更に進展を見ており、今後の発展が期待されている²⁷⁾。一方、メンブレン結合DNAのハイブリダイゼーションアッセイや、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 産物のマグネチックビーズ、ポリマー等への固定化によるハイブリダイゼーションアッセイにおいても HRP-ルミノール化学発光が利用されている⁵³⁾⁵⁴⁾。

4・1・3 イソルミノール誘導体の化学発光試薬としての利用 イソルミノールはルミノールに比べ発光効率が優れており、それ自身あるいはその誘導体が発光試薬として利用されている。1-メトキシ-5-メチルフェナジニウムメチルサルフェート-イソルミノール-マイクロペルオキシダーゼ発光系が、ヒト尿中の1- β -及び6- α -ヒドロキシ胆汁酸及び胆汁酸の高感度計測に利用されている。まず、尿から抽出した胆汁酸はイオン交換クロマトグラフィーで未抱合体、グリシン、タウリン、及び硫酸抱合体に分離する。各抱合体は逆相系カラムで分離後、3- α -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼを固定化したリアクターに通し、生じる NADH との発光を検出する。本システムによる胆汁酸の検出下限は8~250 pmol/テストである。新生児、婦人、妊娠後期の婦人の尿試料では胆汁酸濃度、抱合体型が大きく異なり、胎児期と新胎児期での胆汁酸代謝の相違が示唆されている⁵⁵⁾。イソルミノール誘導体の中でも、Schroederらにより化学発光イムノアッセイ (chemiluminescent immunoassay, CLIA) 用として考案された一連のイソルミノール誘導体は、非常に有用な化学発光誘導体化試薬であり、ピオチンやチロキシン⁵⁶⁾、ステロイドホルモン (エストラジオール、エストリオール、プロゲステロンなど) をはじめ種々の生体成分の分析に適用された。一連の誘導体化試薬を Fig. 5 に示す。これらの試薬を利用する場合に重要なのが縮合剤である。これには、活性エステルの *N,N'*-ジスクシイミジルカーボネイト (DSC) や1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド (EDC)、*N,N'*-ジクロヘキシルカルボジイミド (DCC) などのカルボジイミドが利用できる。*N*-(4-アミノブチル)-*N*-エチ



	R1	R2
isoluminol	H	H
ABEI	CH ₃ CH ₂	(CH ₂) ₄ NH ₂
ABEIHS	CH ₃ CH ₂	(CH ₂) ₄ NHCO(CH ₂) ₂ COOH
AHEI	CH ₃ CH ₂	(CH ₂) ₆ NH ₂

Fig. 5 Isoluminol relative compounds

ルイソルミノール (ABEI) は HPLC のプレカラム誘導体化試薬としても利用されている。例えば、不飽和脂肪酸であるエイコサペンタエン酸のカルボキシル基を利用して ABEI で誘導体化し、逆相系で分離後、マイクロペルオキシダーゼ-過酸化水素を発光試薬として検出すると、注入量当たり、2 pmol~2 nmol の範囲で定量できる。検出感度は 200 fmol である⁵⁷⁾。同じく、6-[*N*-(4-アミノブチル)メチルアミノ]-2,3-ジヒドロ-1,4-フタラジンジオンを誘導体化試薬に用いて、多不飽和脂肪酸の HPLC 分析がなされた。この場合縮合剤には EDC を用い、ペルオキシダーゼ-過酸化水素を発光試薬に利用している⁵⁸⁾。いずれの方法とも血清中の脂肪酸の定量に適用できる。また、DSC を用いれば、ABEI と分析対象物をそれぞれのアミノ基どうして縮合でき、アミン類⁵⁹⁾、覚せい剤のメタンフェタミン⁶⁰⁾などが定量されている。*N*-(4-アミノヘキシル)-*N*-エチルイソルミノールはペプチドのアミノ末端残基の定量に用いられた。非常に高感度であり、500 amol の誘導体が検出できる⁶¹⁾。ABEI 類の誘導体化の特長は、反応が室温、極性溶媒中で進行するなど、非常に緩和な条件下で行える点にある。一方、DSC など2段階の反応で縮合させる場合は、それぞれの反応基質の当量関係を厳密にしなければならない。

4・1・4 その他のルミノール誘導体の化学発光計測への利用 ABEI 類以外にも、ルミノール誘導体を化学発光団とする種々の誘導体化試薬が開発され、主に HPLC 分析に利用されている。4-イソチオシアナトフタルヒドラジドや6-イソチオシアノベンゾ[*g*]フタラジン-1,4-(2*H*,3*H*)-ジオン (IPO) は、イソチオシアノ基とアミノ基の反応を利用してアミノ化合物を誘導体化することができる。4-イソチオシアナトフタルヒドラジドを用いて、12 種のアミノ酸が HPLC 計測されており、その検出感度は 10 fmol 程度である⁶²⁾。また、IPO を用いる HPLC 分析では、抗うつ薬のマプロチリンが検討されているが、添加血漿で

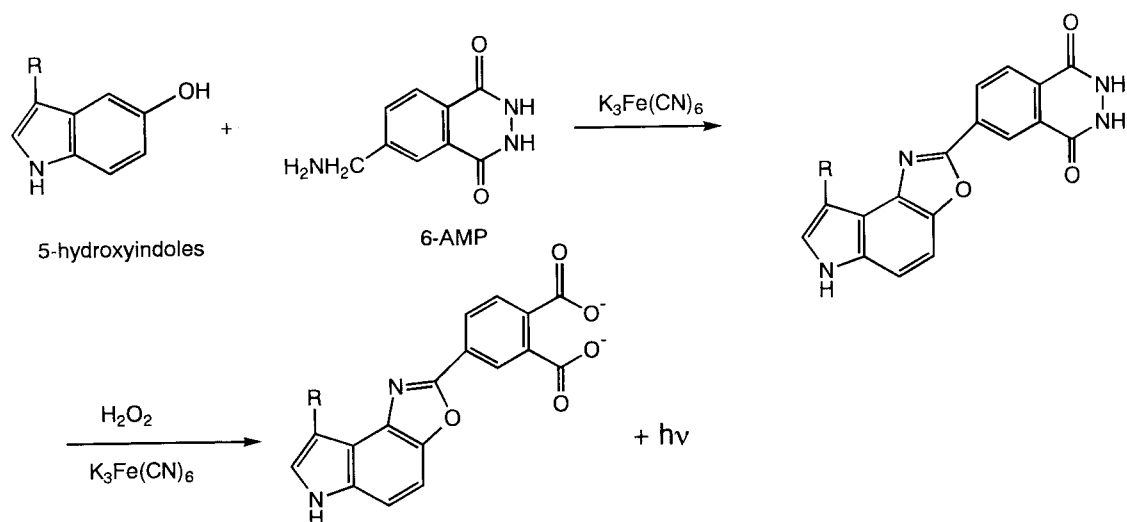


Fig. 6 CL Reaction of 6-AMP with 5-hydroxyindoles

は、0.1 ng/ml が検出できる⁶³⁾。同じく、*n*-ヘキシルアミン、*n*-ヘプチルアミン、*n*-オクチルアミンなどの第一アミンが 30～120 fmol ($S/N = 3$) の範囲で、*N*-メチルオクチルアミン、ジ-*n*-アミルアミン、ジ-*n*-ヘキシルアミンなどの第二アミンが 0.8～3 fmol ($S/N = 3$) の範囲で検出できるなど、ABEI よりも更に高感度な方法が開発されている⁶⁴⁾。また、反応基としてアミノメチル基を有する 6-アミノメチルフタルヒドラジド (6-AMP) が、5-ヒドロキシインドール類の高選択的で高感度な化学発光誘導体化試薬として開発された。ここでは、6-AMP と 5-ヒドロキシインドール類をフェリシアン化カリウム存在下反応させ、生成した化学発光誘導体を逆相系 HPLC により分離し、過酸化水素、フェリシアン化カリウム-NaOH 溶液を化学発光試薬として検出する。検出下限は注入量当たり、0.7～4 fmol ($S/N = 3$) である (Fig. 6)⁶⁵⁾。

分析対象物との反応によりルミノール誘導体に導き、HPLC-化学発光検出するための優れた分析試薬が開発され、種々の生体成分などの計測に利用されている。4,5-ジアミノフタルヒドラジド (DPH) は α -ケト酸と反応して化学発光性のキノキサリン誘導体を与える。9 種の α -ケト酸の DPH 誘導体が HPLC-化学発光検出法で分離定量されている。各誘導体は逆相系カラムで約 50 分をかけて分離後、過酸化水素水溶液及びフェリシアン化カリウム水溶液をポストカラム試薬として検出する。検出下限は 4～50 fmol と非常に高感度である。ヒト血漿中の α -ケト酸の定量に応用されているが、その検出下限は 9～92 pmol/ml 血漿 ($S/N = 3$) であり、この感度により健康人血漿中のフェニルピルビン酸を初めて計測できている⁶⁶⁾。また、DPH は血清や尿の糖タンパクや糖脂質の加水分解で生じる *N*-アセチルノイラミン酸の定量に用いることができる。検出下限は 9 fmol ($S/N = 3$) と高感度であり、試

料量としては血清 10 μ l, 尿 50 μ l で計測することができる⁶⁷⁾。DPH は反応条件を変えると、 α -ジカルボン酸とも反応し化学発光性のキノキサリン誘導体を与える。 α -ジカルボン酸としては、フェニルグリオキサル、ジアセチル、2,3-ペンタンジオン、2,3-ヘキサンジオン、3,4-ヘキサンジオンが検討された。HPLC-化学発光の検出下限は、3,4-ヘキサンジオンが 300 fmol であったのを除けば、いずれも 1.1～8.7 fmol と高感度である⁶⁸⁾。3 α ,5 β -テトラヒドロアルドステロン⁶⁹⁾やデキサメサゾン⁷⁰⁾は α -ケト酸の構造を有するが、これを酢酸銅(II)により α -ジカルボン酸に変換することにより定量的に計測できる。

4.1.5 ルミノール発光系の増感剤とその利用 上述のように、新たな化学発光試薬を開発する試みがなされているにもかかわらず、有用な試薬がほとんど開発できていないのが現状である。そこで、既存の発光試薬の発光効率を増加させることで、より有用な計測法を確立する試みがなされている。ルミノール発光系の増感剤の開発もその一つである。ルミノール-ペルオキシダーゼ-過酸化水素系の化学発光は、4-ヨードフェノール⁷¹⁾などのフェノール化合物や芳香族化合物 (ヒドロベンゾチアゾール、デヒドロルシフェリンなど)⁷²⁾⁷³⁾、あるいはフェニルボロン酸類⁷⁴⁾⁷⁵⁾によりその強度が劇的に増強されることが見いだされ、CLIA における感度の上昇をもたらした。至適条件下では 2800 倍もの発光量の増加が得られている。また、グルコースオキシダーゼなどを標識酵素として過酸化水素を生成させる反応にペルオキシダーゼを共役させる反応系の場合も、本反応を適用して、増感することができる。本反応の増感機構は、完全には解明されてはいないが、HRP を酵素に用いる場合は Fig. 7 で示されるような反応が考えられている。すなわち、HRP と過酸化水素の反応により酸素の授受が起こり、中間体 HRP-I, HRP-II が形成される。

これらがルミノール (LH) から水素を引き抜き、ルミノールラジカル ($L\cdot$) を生成させる。一方、エンハンサー (EH) はルミノールからの ($L\cdot$) の生成を促進する。生成したルミノールラジカルはジアザキノン中間体 (L) を経て、過酸化水素との反応により、アミノフタル酸ジ陰イオン (AP^{2-}) と発光を生じる。これまでに見いだされた主な増感剤を Fig. 8 に示す。

5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル基 (BCI) を有する基質が合成され、本ルミノール増感反応と組み合わせて、ALP

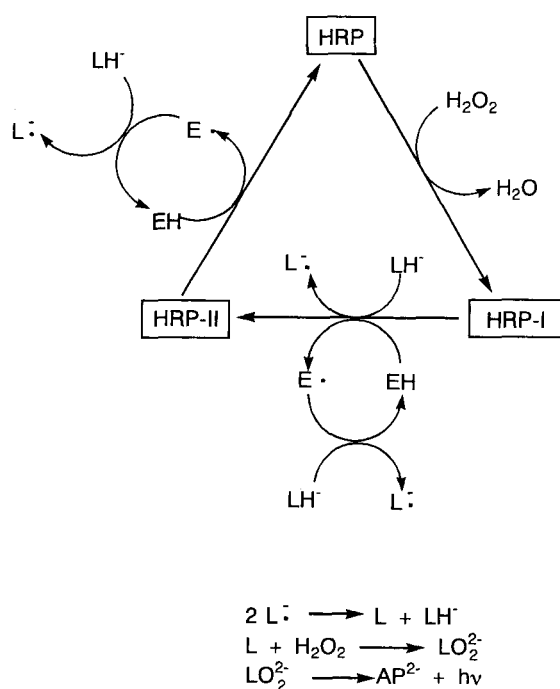


Fig. 7 Proposed enhancement mechanism of CL in luminol-HRP- H_2O_2 system

などが高感度に検出できる。Fig. 9 に示すように、BCI 基質は酵素によりインジゴ色素と過酸化水素に分解されるため、生じた過酸化水素をルミノール増感反応を利用して検出する。この反応は、ALP などをマーカー酵素に用いるハイブリダイゼーションアッセイに利用することができる⁷⁶⁾。

4.2 アクリジン誘導体

アクリジン誘導体の中でルシゲニンは最も古くから知られている発光試薬であり、分析的な適用が種々なされている。ルシゲニンはルミノール同様、過酸化水素により発光するが、還元糖など、有機還元物質との反応でも発光する。

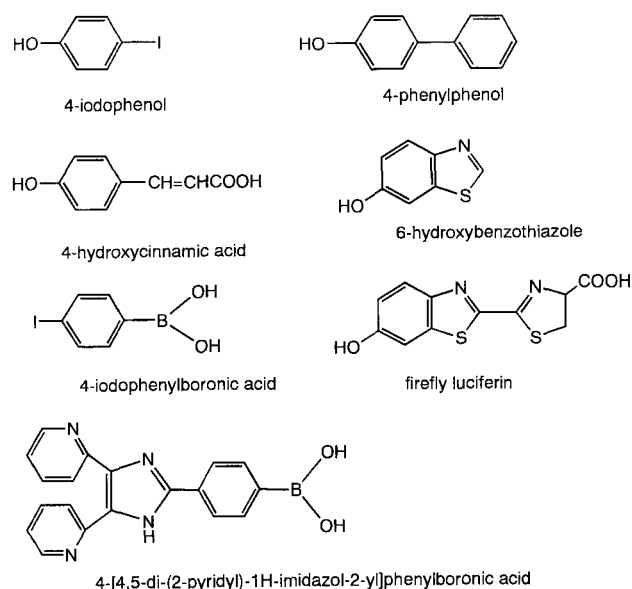
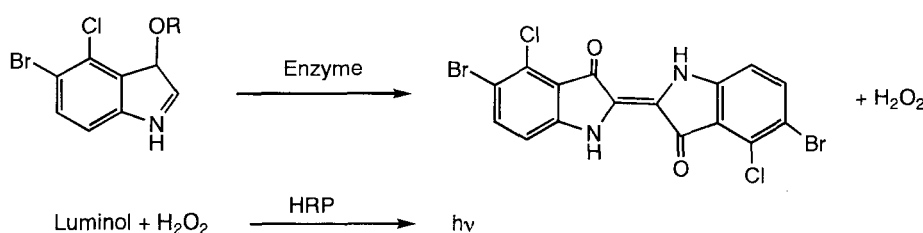


Fig. 8 Enhancers for luminol CL



Substrate (R)	Enzyme
phosphate	Alkaline phosphate
D-galactopyranoside	β -galactosidase
D-glucoside	β -glucosidase

Fig. 9 BCI-substrates for enzymatic reaction and their CL detections

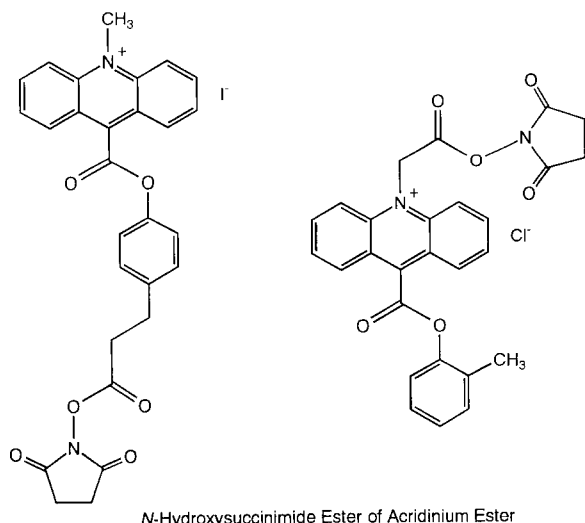


Fig. 10 N-Hydroxysuccinimide ester of acridinium ester as a labeling reagent

これは、前述したようにルシゲニンと α -ヒドロキシカルボニル基の反応に基づいている。したがって、 α -ヒドロキシカルボニル基を有する化合物、例えばグリセルアルデヒド、コルチゾール、フェナシルアルコール類、フェナシルエステル類などを感度良く化学発光計測することができる。この性質を利用して、グルクロン酸抱合体の FIA 分析法が開発された。すなわち、グルクロン酸抱合体を、 β -グルクロニダーゼの IMER を通して加水分解し、グルコン酸とアグリコンとした後、NaOH、ルシゲニン、硫酸ドデシルナトリウム (SDS) の混液と混合し生じる発光を検出する方法である。フェニルグルクロニド、ニトロフェニルグルクロニド、メチルウンベリフェリルグルクロニド、プロモナフチルグルクロニド、エストラジオールグルクロニド、アンドロステロングルクロニドが 5~10 μ M の検出下限で測定できる。この検出系は陰イオン交換カラムを用いる HPLC にも適用することができ、生体の妨害物を取り除くことができる⁷⁷⁾。ルシゲニン水溶液をポストカラム試薬とする逆相系カラムを用いる HPLC-化学発光法により、注入量で 0.5 pmol の検出が可能なコルチコステロイド類及び *p*-ニトロフェナシルエステル類の計測ができている⁷⁸⁾。また、ルシゲニンがカテコールアミン類とアルカリ溶液中で発光することを利用した定量法が検討された。本反応を利用すると、 $1 \times 10^{-7} \sim 1 \times 10^{-4}$ M のカテコールアミンが定量可能であり、また HPLC にも適用可能であることが示された⁷⁹⁾。

アクリジニウムのエステル類や酸クロリドを化学発光誘導体化剤に利用して、微量成分のイムノアッセイや HPLC 分析ができる。ルミノールに比べ、アクリジニウム誘導体は 100 倍も発光が強く、またアクリジニウム標識試薬 (Fig. 10) は、抗原や抗体が結合してもその発光能がほと

んど減少しない特長を有する。これらの特長を生かして、種々のアクリジニウムの活性エステルが開発され、ハイブリダイゼーションアッセイにおける相補的 DNA (cDNA) プロープ⁸⁰⁾、ヒトじゅう (絨) 毛性ゴナドトロピン、TSH などのホルモン⁸¹⁾、ウイルス、腫瘍マーカーのイムノアッセイなどに用いられている。例えば、ケミルミ腫瘍特異抗原 (TSA) キットなどの測定キットとして市販され実際の臨床検査に適用されている。これは従来のラジオイムノアッセイ (RIA) 法の測定感度に比べ 10 倍も高感度であり、血中濃度が 0.01 μ U/ml の TSH を測定することができる。これにより、健康人の血中濃度 0.53~3.05 μ U/ml とバセドウ病患者の血中濃度 <0.10 μ U/ml とを完全に区別することができる⁸²⁾。

一方、環境汚染物質として重要な測定対象物の一つであるクロロフェノール類の HPLC-化学発光検出に、10-メチル-9-アクリジニウムカルボキシレートが利用されている。HPLC による分析では、10-メチル-9-アクリジニウムカルボキシレートを逆相系カラムで分離し、塩基触媒下、過酸化水素で酸化・発光させて検出する。発光収率は各発光体に依存するが、1.25 fmol~300 amol ($S/N = 3$) の範囲で非常に高感度に検出できる⁸³⁾。

4.3 アリールシュウ酸誘導体

4.3.1 PO-CL に用いるアリールシュウ酸エステル誘導体と蛍光物質の選択 PO-CL を利用する計測法は多岐にわたっている。基質となるアリールシュウ酸エステル (又はオキサミド) 誘導体、過酸化水素、増感剤としての蛍光物質及び反応を触媒する塩基の各濃度が、それぞれ発光量に比例するように反応条件を設定することで、これらを定量的に分析することができる。PO-CL が最も利用されているのは、蛍光物質の計測である。前述のように、本反応系では、アリールシュウ酸エステルと過酸化水素の反応で生じる高エネルギーな置換ジオキセタンのエネルギーを蛍光物質に移動させることで蛍光物質が励起され、発光が生じると考えられている。したがって、基質である過酸化水素とアリールシュウ酸エステルが十分に供給されれば、蛍光物質の励起と発光を繰り返すことになり、効率的に発光を得ることができる。原理的にはすべての蛍光物質が測定可能であるが、実際は、次の化学発光収率を求める式に示すように、酸化電位が低く、励起収率に優れ、蛍光量子収率の大きな化合物が強い発光を与える。例えば、ペリレンやルブレンなどの多環芳香族炭化水素などはその例である。

$$\Phi_{CL} = \Phi_{chem} \times \Phi_{trans} \times \Phi_{FL}$$

ここで、 Φ_{CL} : 化学発光量子収率; Φ_{chem} : 化学反応収

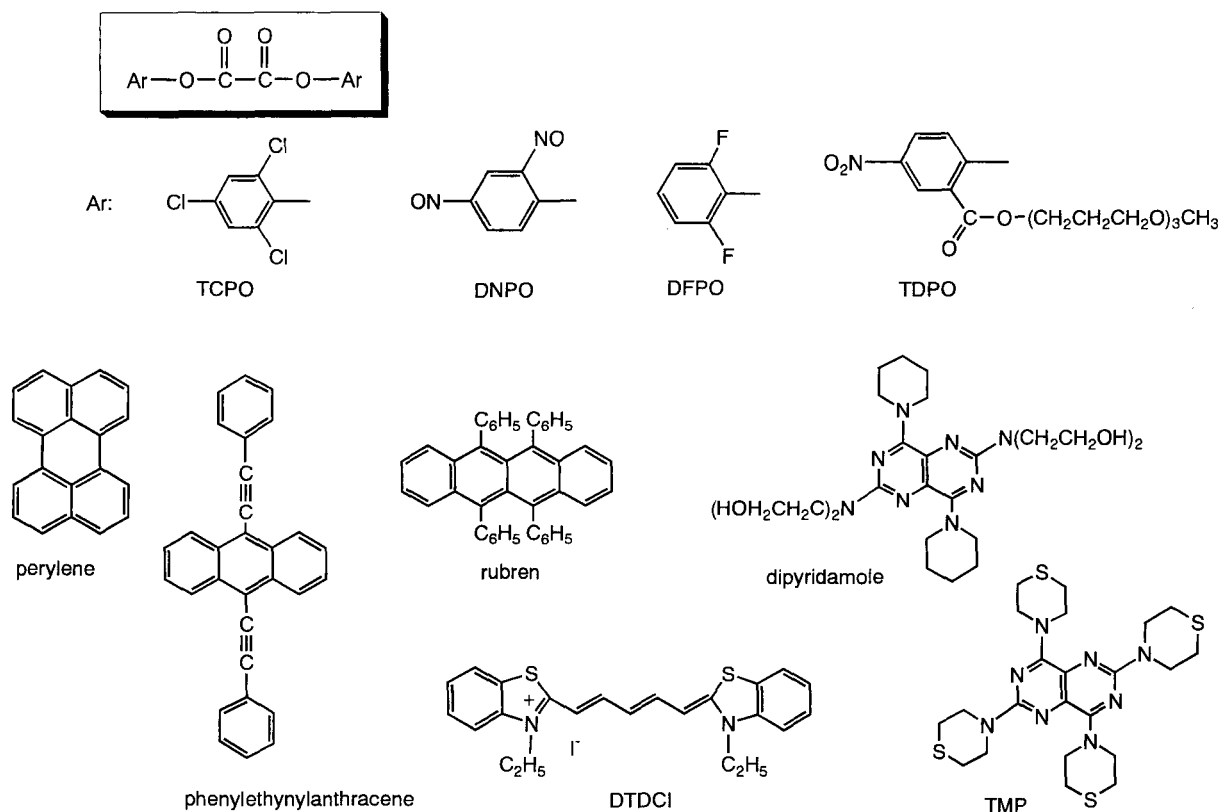


Fig. 11 Structures of aryloxalates and fluorophores used in PO-CL

率; Φ_{trans} : エネルギーの移動効率; Φ_{FL} : 蛍光量子収率, を示す。

これまで、多くのアリールオキサレート (又はオキサミド) 誘導体が合成され¹⁴⁾, 分析試薬として検討されてきたが、繁用されているのは合成が容易で安価なビス(2,4,6-トリクロロフェニル)オキサレート (TCPO) である。反面、TCPO は HPLC で繁用されるアセトニトリルなどの有機溶媒への溶解度が低く、10 mM 程度が限界である。そのため、限界に近い試薬濃度では送液ラインや検出セル中で析出することもある。TCPO に比べ有機溶媒に溶けやすく発光効率が優れた、ビス[2-(3,6,9-トリオキサデシルオキシカルボニル)-4-フェニル]オキサレート (TDPO) も利用されるが、高価である。PO-CL で用いられるアリールシウ酸エステル類及び蛍光物質を Fig. 11 に示した。なお、実際に定量法を開発するに当たっては、発光反応収率を最大にするため、各試薬の濃度はもちろんのこと、液性、試薬混合のタイミング、溶媒などそれぞれ至適な条件を採用するように、慎重な検討が必要である⁸⁴⁾⁸⁵⁾。

4・3・2 蛍光物質計測への応用 生体成分や環境汚染物質などを高感度に計測するのに PO-CL は優れた方法の一つであるが、これらの化合物が蛍光性であることは非常に少ない。このような場合には、蛍光試薬で誘導体化し発光性とした後、本方法で測定する。蛍光誘導体化試薬は、

これまでに非常に数多く開発されており、PO-CL に応用することができる。まず、それ自体が蛍光性を有する化合物の計測例として、血小板改善薬のジピリダモールや抗炎症作用薬のベンジダミンのラット血漿中濃度測定⁸⁶⁾, メジャートランキライザーのフェノチアジン系薬物の分析などの例を挙げることができる⁸⁷⁾。一方、大気中の多環芳香族化合物の中には発光性のものが多数知られており、PO-CL で検出することができる。例えば、TCPO-過酸化水素を発光試薬とする FIA が検討され、大気中のペリレン、アントラセン、ピレンがそれぞれ 0.05, 65, 75 pg (S/N = 5) で検出できる方法が開発された。また、ニトロ体 (ニトロアレーン類) は変異原性が強いことが明らかにされているが、ニトロ体は蛍光性ではないため、これらを NaHS, 金属亜鉛などで還元し、アミノ体とすれば発光性となる。例えば、ジニトロピレン類をオフラインで還元し、FIA 定量することができる。金属を含まないプラスチックフレームのカラムとテフロン製のラインを使用することで、分析感度や再現性を高めている。1,8-及び1,6-ジニトロピレンは 0.025 pg, 1,3-ジニトロピレンは 0.05 pg が検出できる (S/N = 5)⁸⁸⁾。一方、NaHS を還元剤としてオフラインでニトロ体を還元後、HPLC-PO-CL 検出する方法が開発され、自動車排ガス粒子中の 1,3-, 1,6-, 1,8-ジニトロピレン定量に適用された⁸⁹⁾⁹⁰⁾。同じく、多環芳香族炭

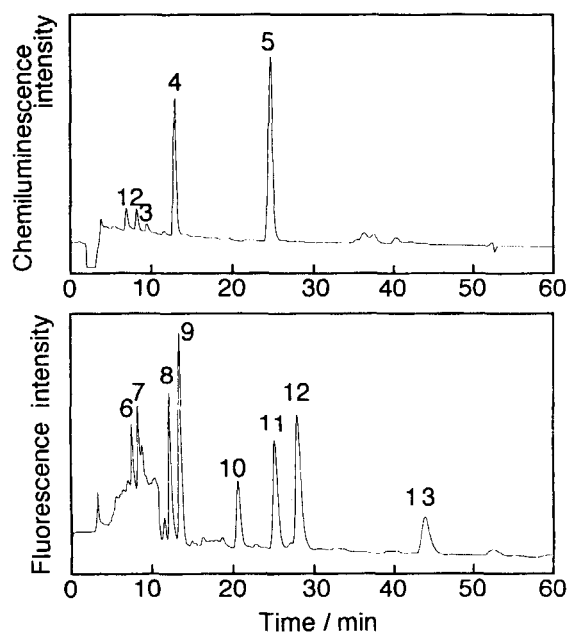


Fig. 12 Chromatograms of benzene/ethanol extract from airborne particulates

Peaks 1: 1,6-DNP; 2: 1,8-DNP; 3: 1,3-DNP; 4: 2-fluoro-7-nitrofluorene; 5: 1-NP; 6: fluoranthene; 7: pyrene; 8: benzo[*a*]anthracene; 9: chrysene; 10: benzo[*b*]fluoranthene; 11: benzo[*k*]fluoranthene; 12: benzo[*a*]pyrene; 13: coronene

(Reproduced from ref. 91: *Bunseki Kagaku*, 43, 1017 (1994) with permission from The Japan Society for Analytical Chemistry)

化水素とそのニトロ体の同時定量が試みられ、切り換えバルブやミニカラムを利用して、それぞれに適した溶離条件で分離後、蛍光及び PO-CL 検出する高感度な方法が開発された。サブ mg の大気浮遊粉じん中の多環芳香族化合物やニトロ体が検出できている (Fig. 12)⁹¹⁾。引き続き、オンラインによる還元が検討され、ニトロ体を逆相系カラムで分離後、金属亜鉛などを充填したカラムを通過させてアミノ体に還元し、TCPO-過酸化水素により発光、検出する方法が開発された⁹²⁾。大気中のニトロアレーン類が注入量当たり、2~50 fmol で検出できる⁹³⁾。その後、5 種類のモノニトロ体の同時分析が検討され、より高感度な計測が達成されている。すなわち、6-ニトロクリセン、2-ニトロフルオランテン、1-, 2-, 4-ニトロピレンが 0.3~5 fmol で検出できる⁹⁴⁾。また、電気化学的にオンライン還元して、自動車排ガス中のすすに含まれるニトロピレン及びその誘導体を測定する試みもなされている⁹⁵⁾。

近赤外領域に吸収を示す色素は、生体成分などからの吸収による妨害を防ぐ上で、分析試薬として有望であるが、開発された例は少ない。これらの色素は、また弱いエネルギーで励起することが可能であり、PO-CL には非常に有利である。幾つかの近赤外色素の HPLC-化学発光検出が

検討されているが⁹⁶⁾、メチレンブルー、ピリジン 1、オキサジン 1、3,3'-ジエチルチアジカルボシアニンヨウ素塩 (DTDCI, Fig. 11) の検出下限は、注入量当たり 120, 27, 31, 0.19 fmol であった。DTDCI の検出は非常に高感度で蛍光検出の 250 倍の感度に相当する。したがって、DTDCI はジピリダモールなどとともに、PO-CL に用いる蛍光誘導体化試薬のリード化合物として期待したい。

4.3.3 アミン類の計測への応用 アミン類を蛍光誘導体化後、PO-CL で検出する方法としては、アミノ酸のダンシルクロリド (Dns-Cl) 誘導体の TLC 分析が最初の例である⁹⁷⁾。Dns-Cl はアミン類の蛍光誘導体化剤として繁用されるが、PO-CL に適した誘導体を与えるのがその理由の一つである。例えば、ブチルアミン~*n*-デシルアミンの脂肪族第一アミンの Dns 誘導体、4-クロロ-7-ニトロベンゾ-1,2,5-オキサゾール (NBD-Cl) 誘導体及び *o*-フタルアルデヒド (OPT) 誘導体の HPLC 定量が比較検討されている。Dns 誘導体は 0.8~14 fmol、NBD 誘導体は 19~270 fmol、OPT 誘導体は 94~580 fmol であり、Dns 誘導体が PO-CL 系の発光に適していることを示している⁹⁸⁾。また、アミノ酸の Dns 誘導体が HPLC-PO-CL で高感度に定量されている。4 種のダンシルアミノ酸 (Dns-Ala, -Gln, -Met, -Leu) を逆相系カラムで分離後、TCPO-過酸化水素で発光、検出する。検出下限は注入量当たり 10 fmol と高感度である⁹⁹⁾。同じく、16 種のダンシルアミノ酸 (Dns-Asp, -Asn, -Gln, -Ser, -Gly, -Thr, -Ala, -Pro, -Lys, -Val, -Arg, -Met, -Ileu, -Leu, -Trp, -Phe) をグラジエント溶離すると、それぞれを 30 分以内で分離でき、2~5 fmol ($S/N=2$) が検出できる¹⁰⁰⁾。この方法は、マイクロボアカラム (250×1 mm, i.d.) を用いることで、更に高感度化が可能であり¹⁰¹⁾、4 種のダンシルアミノ酸 (Dns-Ala, -Val, -Ileu, -Phe) が 0.2 fmol ($S/N=3$) の感度で検出できる。マイクロボアカラムを用いる方法は、ブラジキニンモデル化合物とする N 末端アミノ酸分析にも利用されている¹⁰²⁾。ダンシル誘導体の HPLC-化学発光計測は、覚せい剤にも適用されている。尿中のメタンフェタミンやその代謝物であるアンフェタミンを検出・定量することは、覚せい剤摂取を証明するために必要であり、覚せい剤乱用による犯罪を予知・予防する上でも重要となる。覚せい剤はダンシル化後、分離検出すると、尿中濃度で 2×10^{-10} M レベルが検出できる¹⁰³⁾¹⁰⁴⁾。毛髪中の覚せい剤はダンシル誘導体化後 PO-CL 検出され、毛髪 1 本中 (20 pg) の検出が可能な方法が開発された¹⁰⁵⁾。抗不整脈薬のメキシレチンをダンシル化し、HPLC 分離後、TDPO-過酸化水素を発光試薬として検出している。ラット血漿中のメキシレチンの定量に適用し、定量範囲は 20~100 ng/ml、検出下限は注入量で 1.0 fmol である¹⁰⁶⁾。一方、カテコールアミン類は末しょう(梢)交感神経伝達物質やホルモンと

しての生理作用を有する非常に重要な生体物質であるが、フルオレスカミンによりカテコールアミン類を蛍光誘導体に導くことができる。これらの誘導体は、TDPO-過酸化水素発光試薬を用いる HPLC 分析で 25 fmol が検出でき、それまで用いられていた蛍光検出の 20 倍の感度が得られている。この方法をヒト尿の定量に適用した場合、必要とする試料量はわずか 10 μ l であった¹⁰⁷⁾。ところで、蛍光検出のほうが化学発光検出よりも高感度な例が報告されている。例えば、フルオレスカミンをヒスタミンの誘導体化に用いた HPLC 分析の場合、蛍光検出を用いるほうが化学発光検出よりも 100 倍程度高感度である¹⁰⁸⁾。この例のように PO-CL 検出の場合、利用できる溶離液が制限されたり、溶媒によっては期待される発光強度が得られず、蛍光検出よりも感度が低くなる場合がある。その他、フルオレスカミンを誘導体化剤に用いる例として、動物組織中のスルファメタジンの残留濃度が計測されている。蛍光誘導体は HPLC 分離後、TDPO-過酸化水素を発光試薬として検出し、鶏卵及び血清に適用している。標準溶液で、1 ng/ml の検出感度を得ている¹⁰⁹⁾。4-(*N,N*-ジメチルアミノスルホニル)-7-フルオロ-2,1,3-ベンゾジアゾール (DBD-F) は NBD-F と同様、それ自体ほとんど蛍光性を示さないが、第一、及び第二アミン類と容易に反応して発光体を与える。例えば、DBD-F を用いて覚せい剤のメタンフェタミン及びその関連化合物 (アンフェタミン、*p*-ヒドロキシメタンフェタミン、*p*-ヒドロキシアンフェタミン、エフェドリン、ノルエフェドリン) の一斉分離分析が達成された。6 種の DBD-誘導体は、DBD-*N*-エチルベンジルアミンを内標準として逆相系カラムでグラジエント溶離された後、TDPO-過酸化水素を発光試薬として検出する。25~133 fmol ($S/N=3$) の検出感度を得られている¹¹⁰⁾。同じく、尿中のメタンフェタミン単独の定量にも利用されている¹¹¹⁾。DBD-F はアミノ酸、エピネフリン、あるいは β -遮断薬のメトプロロールの計測にも利用することができる¹¹²⁾。ナフタレン-2,3-ジカルボキサルデヒド (NDA) は第一アミンと反応して、発光体であるシアノベンゾ[*f*]イソインドール (CIB) 誘導体を与える¹¹³⁾。この反応を利用する HPLC-化学発光法はドーパミン、ノルエピネフリンをサブ fmol~fmol レベルで検出でき、定量に必要な尿試料はわずか 20 μ l である。なお、アリールシュウ酸エステルには DNPO が用いられている¹¹⁴⁾。同じく、抗うつ薬のフルボキサミンの定量にも利用されている¹¹⁵⁾。

カテコールアミン類 (ノルエピネフリン、エピネフリン、ドーパミン) がエチレンジアミンと反応して蛍光体を与えることを利用して、これらの HPLC 定量法が開発されている。まず、溶出したカテコールアミン類とエチレンジアミンをオンラインで反応させた後、TDPO-過酸化水素で発光・検出させるもので、非常に高感度であり、注入量当

たり 1 fmol ($S/N=2$) の検出が可能である¹¹⁶⁾。本法は自動化が可能であり、ラット血漿中のカテコールアミンの全自動分析が確立されている¹¹⁷⁾。また、このカテコールアミン全自動分析は強心薬の (-)-イソプロテレノール及び (-)-(*R*)-1-(3,4-ジヒドロキシフェニル)-2-[(3,4-ジメトキシフェネチル)アミノ]エタノールのラット血漿中濃度測定に適用され、注入量でそれぞれ、1.3 及び 0.9 fmol の検出が達成されている¹¹⁸⁾。同じくカテコールアミン類は 1,2-ジアリルエチレンジアミン誘導体とも反応して蛍光体を生成する。この反応をカテコールアミン類のプレカラム誘導体化に利用し、誘導体を逆相系のカラムで分離後、TDPO-過酸化水素を発光試薬として検出することができる。注入量で amol ($S/N=3$) レベルの感度が実現している¹¹⁹⁾。ルミナリン 1 は、蛍光団であるキノリジノクマリン骨格と反応部位の *N*-ヒドロキシスクシンイミド エステルを有し、アミンと反応して蛍光体を与える。第一アミンとの反応 (50°C, 20 分) が第二アミンとの反応 (70°C, 120 分) よりも早い。ベンチルアミン、ピロリジン、チアミン、プロリン等を誘導体化して HPLC 分離後、TCPO-過酸化水素により発光、検出すると注入量で 15~100 fmol ($S/N=3$) の検出感度を得ている。これは、蛍光検出に比べ 3~10 倍程度の増感である¹²⁰⁾。アミン類の分析に用いられる誘導体化試薬を Fig. 13 に示す。

4・3・4 カルボニル化合物の計測への応用 カルボニル化合物はダンシルヒドラジン (5-*N,N'*-ジメチルアミノナフタレン-1-スルホヒドラジド, Dns-H) を用いて蛍光誘導体化することができる。例えば、血漿中のオキソステロイド類、オキソ胆汁酸のエチルエステル類は、ゲル浸透クロマトグラフィーで精製後、逆相系カラムで分離し、TDPO-過酸化水素試薬で発光・検出することができる。コルチコステロン、テストステロン、プロゲステロンの検出下限はそれぞれ 3, 2, 4 fmol ($S/N=2$) である¹²¹⁾。また、異常なオキソ胆汁酸である、7 α -ヒドロキシ-3-オキソ-5 β -コラン酸がコレステロール性肝病患者尿中から nmol/l レベルで検出できている。3 α -又は 3 β -ヒドロキシステロイド、3 β -ヒドロキシ-5-コレン酸、プレグナンジオール、5-プレグネン-3 β ,20 β -ジオール、5-プレグネン-3 β ,20 α -ジオールなど水酸基を有するステロイド類は、固定化したヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼで 3-オキソステロイドに変換後、Dns-H で誘導体化することができる。これらを逆相系カラムの HPLC で分離後、化学発光検出すると、数 fmol レベルで検出することができる¹²²⁾。Dns-H は糖の蛍光誘導体化にも利用され、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸などの定量が行われている。ヒアルロン酸をヒアルロニダーゼ SD で不飽和のジサッカライドである Δ di-HA に変換し、Dns-H と反応させ蛍光誘導体とする (Fig. 14)¹²³⁾。同様に、コンドロ

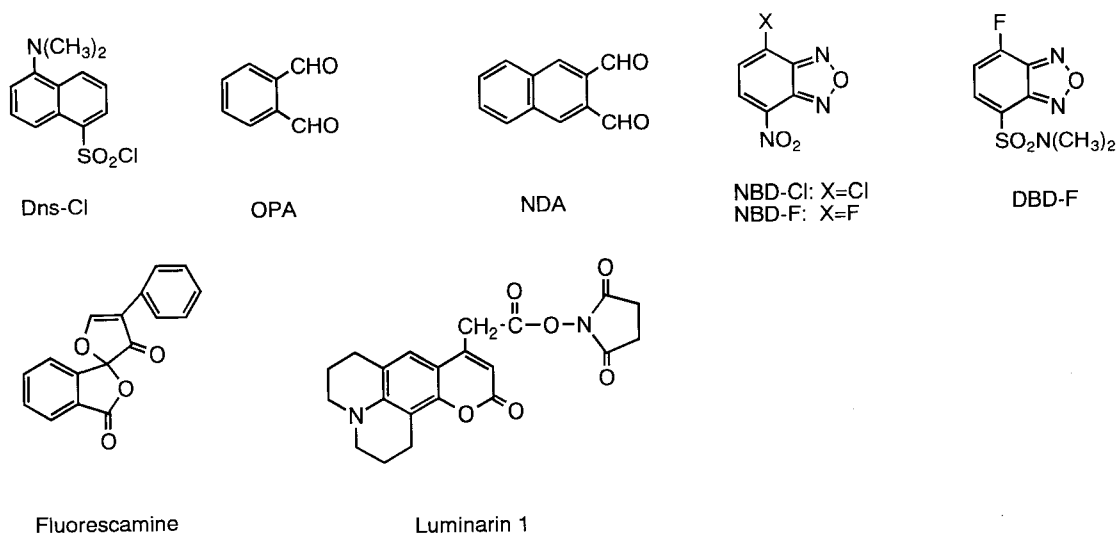
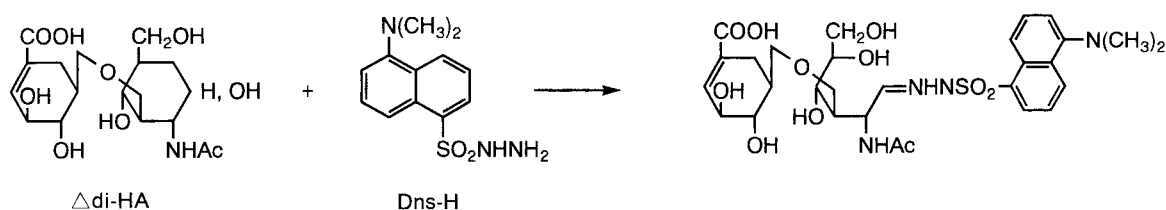


Fig. 13 Labeling reagents for amines used in PO-CL

Fig. 14 Reaction of Δ di-HA with Dns-H

イチン硫酸やデルマトン硫酸も不飽和のジサッカライドに変換し、Dns-Hで誘導体化する。これらのジサッカライドは注入量で 100 fmol ($S/N = 3$) が検出でき、ラット腹膜肥満細胞中のこれらの分析に適用されている¹²⁴⁾。環境中のカルボニル化合物（ホルムアルデヒド、アセトアルデヒド、アセトン）の Dns 誘導体の HPLC-PO-CL が開発されている。Dns-H をポーラスなガラス粒子に浸漬したものをカートリッジに充填し、これに空気を通してカルボニル化合物を捕集・誘導体化するもので、サブ ppb レベルの検出が可能であり、比較的短時間でサンプリングできる¹²⁵⁾。ベンゾフラザン系の 4-(*N,N*-ジメチルアミノスルホニル)-7-ヒドラジノ-2,1,3-ベンゾキサジアゾール (DBD-H) はそれ自体非常に弱い蛍光しか示さないが、カルボニル化合物と反応して発蛍光体を与える。合成プロゲステロンのメドロキシプロゲステロンアセテート (MPA) は強力なプロゲステロン作用薬であるが、DBD-H と反応して蛍光体を生成する。血清を用いた場合の定量範囲は、15.6～96.6 ng/ml であり、検出下限は 9 ng/ml と高感度で、血清試料は 100 μ l で済む¹²⁶⁾。神経細胞保護作用薬、プロベントフィリンの DBD 誘導体 (Fig. 15) の HPLC-化学発光検出も検討され、TDPO-過酸化水素を用いる発光・検

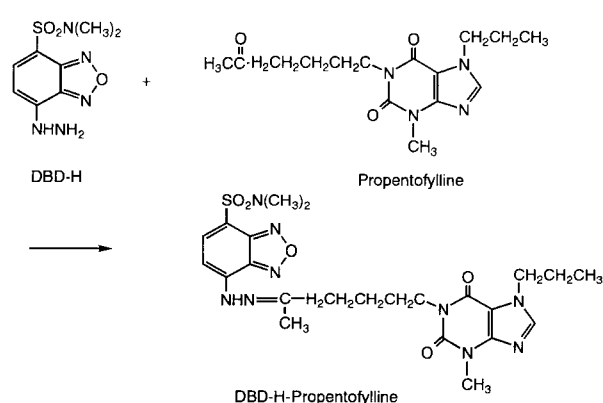


Fig. 15 Reaction of propentofylline with DBD-H

出で、注入量当たり 0.031 ng の感度を得ている。本法はラットにベントフィリンを静注後、脳海馬領域のマイクロダイアリシスにより得られた透析液の測定に初めて適用された。静注後、1 時間までの透析液中の薬物濃度の測定が可能であった。したがって、脳機能を改善する可能性のある薬物の脳内動態を調べるのに、有用な手法の一つであると思われる¹²⁷⁾。3-アミノフルオランテンがアルデヒドやケ

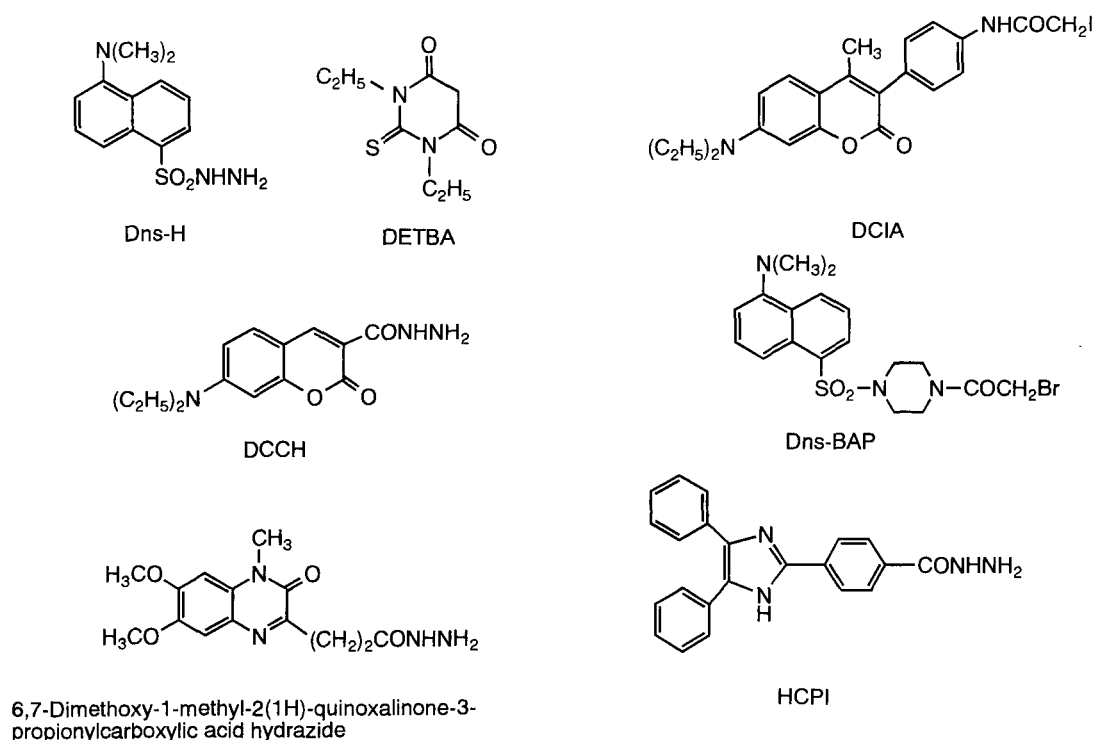


Fig. 16 Labeling reagents of carbonyl compounds and carboxylic acids used in PO-CL

トンの蛍光誘導体化に利用されている¹²⁸⁾。マロンジアルデヒド (MDA) は多不飽和脂質の過酸化反応により生じる二次生成物であるが、生体内過酸化脂質のマーカーとして重要な化合物である。また、DNA への付加物は発がん性との関連も指摘されている。MDA は 2-チオバルビツール酸と赤色の色素を形成するため、これを利用した比色分析が古くから行われてきた。HPLC への適用と高感度化を図るために種々のチオバルビツール酸誘導体が合成され、検討された結果、蛍光誘導体化試薬として、1,2-ジフェニル-2-チオバルビツール酸や 1,3-ジエチル-2-チオバルビツール酸 (DETBA) が有用であることが示された。MDA の DETBA 誘導体を逆相系のカラムを用いて HPLC 分離後、TCPO-過酸化水素で発光させると、20 fmol ($S/N = 2$) が検出できる。この方法は、ラット脳の高画分中の MDA 定量に初めて適用されている¹²⁹⁾。

4・3・5 カルボン酸の計測への応用 カルボン酸の蛍光誘導体化には、4-ブロモメチル-7-メトキシクマリン (Br-Mmc)、7-ジエチルアミノクマリン-3-カルボヒドラジド (DCCCH)、7-ジエチルアミノ-3-[(4-ヨードアセチルアミノ)フェニル]-4-メチルクマリン (DCIA) などのクマリン誘導体がよく用いられるが、各試薬による誘導体の TCPO-過酸化水素による PO-CL を評価した結果、Br-Mmc の誘導体は発光を生じなかった。これは、誘導体を励起するのに必要なエネルギーが供給されていないためと

考えられる。なお、DCIA の誘導体は直鎖脂肪酸に対し、低 fmol レベルの検出感度を与えた¹³⁰⁾。N-(プロモアセチル)-N'-[5-(ジメチルアミノ)ナフタレン-1-スルホニル]ピペラジン (Dns-BAP) がカルボン酸の蛍光誘導体化試薬として開発され、HPLC-PO-CL に適用された。18-クラウン-6、炭酸水素カリウムの存在化、非プロトン溶媒中、55℃、30 分で誘導体化する。逆相系カラムで分離後、ビス(2-ニトロフェニル)オキサレートと過酸化水素を発光試薬に検出する。ビタミン A の前駆体であるレチノイン酸の検出下限は 25 fmol である¹³¹⁾。6,7-ジメトキシ-1-メチル-2(1H)-キノキサリノン-3-プロピオンカルボン酸ヒドРАЗドは EDC, DCC を縮合剤として、アラキドン酸代謝物の蛍光誘導体化に用いられた。TCPO-過酸化水素を発光試薬とする HPLC の検出下限は、注入量で 500 amol ($S/N = 3$) と非常に高感度である¹³²⁾。2-(4-ヒドラジノフェニル)-4,5-ジフェニルイミダゾール (HCPI) も脂肪酸の蛍光ラベル化に用いることができる。化学発光検出では、12~18 fmol ($S/N = 2$) の感度である¹³³⁾。いずれもヒト血清中の脂肪酸の定量に用いることができる。また、7-(ジエチルアミノ)クマリン-3-カルボヒドラジド¹³⁴⁾やルミナリン 4¹³⁵⁾もカルボキシル基の蛍光誘導体化に使用され、PO-CL 検出で、数十 fmol の検出感度を得ている。PO-CL に用いるカルボン酸の蛍光誘導体化試薬を Fig. 16 に示した。

4・3・6 チオール、アルコール、フェノール、その他の

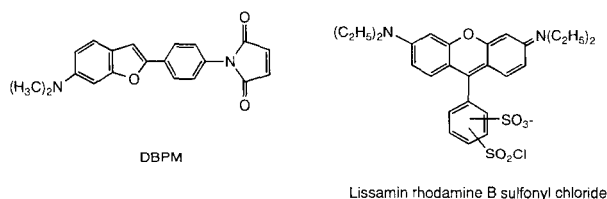


Fig. 17 DBPM and Lissamin rhodamine B sulfonyl chloride

計測への応用 チオール及びアルコール類の蛍光誘導体がPO-CLに利用されている例は意外に少ない。チオール類の蛍光誘導体化には、*N*-[4-(6-ジメチルアミノ-2-ベンゾフランイル)フェニル]マレイミド (DBPM) が利用されている。DBPM はほかのマレイミド型のチオール試薬と同様、それ自体は無蛍光であるが、チオール類と反応して発蛍光体を生じるため、これらの蛍光分析あるいはHPLC-蛍光検出に利用されている。分析法の感度を上げるため、TCPO-過酸化水素発光試薬を用いるHPLC-PO-CLに適用された。生体内の酸化還元など重要な役割を果たすグルタチオン、システイン、*N*-アセチルシステイン、システアミンなどの生体チオール類や抗リウマチあるいは重金属解毒薬のペニシラミンをDBPMと60℃、30分間反応させた後、逆相系カラムで分離する。誘導体は約12分で分離され、検出下限は7～113 fmol ($S/N=2$) である。ラット肝臓中のグルタチオンやシステインの定量に適用された¹³⁶⁾。エストラジオールを血清中から固相抽出し、ダンシル誘導体とした後、順相系のカラムで分離・検出する方法が検討された。TCPO-過酸化水素-トリエチルアミンで発光させると、50 pgの検出感度が得られる。近年、順相系のHPLCが非常に少なくなっているが、PO-CLは極性溶媒よりは無極性溶媒中で強く発光する場合が多く順相系の検出に適している。本研究は順相系のHPLCにPO-CLを採用した数少ない例の一つである¹³⁷⁾。フェノール類の蛍光誘導体化は、リサミンローダミンBスルホニルクロリドを用いて行われている。ローダミン誘導体は蛍光収率が高く、発光波長が長波長 (>550 nm) にあるため、バックグラウンド発光の影響が少ないことや、重原子置換基が発光を消光しないなどの特長がある。本誘導体化反応は非常に迅速であり、室温、1分でよい。クロロフェノールのリサミンローダミンB誘導体を逆相系又は順相系のカラムによる分離後、化学発光検出すると、いずれも低pgレンジで検出できる。また、河川水に添加したペンタクロロフェノールが前処理なしで0.8 ppbの低濃度でも検出できている¹³⁸⁾。DBPM及びリサミンローダミンBスルホニルクロリドをFig. 17に示した。

その他、カルボン酸の誘導体化試薬、DCIA (Fig. 16) は抗がん剤として使用されているフルオロピリミジン類の

蛍光誘導体化に利用することができる。ここではクラウンエーテル・カリウム錯体を触媒に用いる。5-フルオロウラシル、5-フルオロウリジン、1-(テトラヒドロ-2-フランイル)-5-フルオロウラシルが数十 fmol レベルで検出できる¹³⁹⁾¹⁴⁰⁾。金属イオンを蛍光キレート試薬、8-ヒドロキシキノリンで蛍光性の錯体とした後、FIAあるいはHPLC-PO-CL定量することができる。アルミニウム(III)、亜鉛(II)、カドミウム(II)、インジウム(III)のFIAにおける検出下限は20～70 ppbである¹⁴¹⁾。

4.3.7 過酸化水素及びそれを生じる酵素反応基質の計測とその応用 PO-CLのもう一つの特長である、過酸化水素及びそれを生じる酵素系の基質あるいは酵素活性の高感度測定も多く例が報告されている。計測方法としては、バッチ法、フローインジェクション法、HPLC法、写真法など多彩な方法があり、目的に応じてそれぞれ利用される。PO-CLの酸化反応の基質として、種々の過酸化物が検討されたが、過酸化水素が最も優れており、専ら利用されている。本発光反応を利用して過酸化水素を効率良く測定するには、増感剤の蛍光物質が重要となる。Fig. 11に示したジピリダモールはこの目的に適した蛍光物質の一つであるが、更に効率の良い蛍光体を開発するため、多数のピリミド[5,4-*d*]ピリミジン類が合成され、評価された。誘導体の中で、2,4,6,8-テトラチオモルホリノピリミド[5,4-*d*]ピリミジン (TMP, Fig. 11) は検討した蛍光物質の中では最も強い発光を与え、過酸化水素の定量に適していることが明らかにされた¹⁴²⁾。TCPO-過酸化水素-TMPの発光系を利用して、バッチ法により、 1×10^{-8} Mの過酸化水素を定量することができる¹⁴³⁾。過酸化水素を逆相系カラムで分離後、TCPO-TMPのアセトニトリル混合液をポストカラム発光試薬として、発光・検出するHPLC法は、PO-CL検出による初めての方法であり、188 fmol ($S/N=3$) (9.9×10^{-9} M)の検出感度が得られている。この方法を利用して、コーラ飲料水あるいは市販のヒドロペルオキシド試薬などに含まれる極微量の過酸化水素が計測されている¹⁴⁴⁾。ローダミン誘導体は優れた増感作用を示すが、スルホローダミン101を増感剤に用いるFIA法は、TDPOを発光試薬に用いて、 3×10^{-9} Mの過酸化水素を検出できる非常に高感度で簡便な方法である¹⁴⁵⁾。また、3-アミノフルオランテンをポアガラスで固定化した、固定化蛍光色素を利用するFIA法では 1×10^{-8} Mの検出感度を得ている¹⁴⁶⁾。

IMERを利用する場合は、先にも述べたように、酵素反応の至適条件や発光反応の至適条件を十分に考慮して計測条件を設定しなければならない。例えば、フロー系のキャリアー溶液 (緩衝液)、流量、pH、反応温度、触媒、発光試薬 (オキサレート、蛍光増感剤)、有機溶媒など注意深く検討する必要がある。L-アミノ酸オキシダーゼのIMER

を利用して、8種のL-アミノ酸の光学選択的なHPLC定量が開発され、尿やビール中のL-アミノ酸の定量に適用されている¹⁴⁷⁾。グルコースオキシダーゼやウリカーゼのIMERを用い、化学発光試薬にTCPO-TMPを利用するグルコースや尿酸のFIA法が開発され、ヒト血清の定量に適用されている。試料の前処理が不要であり、希釈血清を注入するだけの簡便な方法である⁴⁸⁾。ルミノールを利用するFIA同様、簡便で高感度な方法であり、臨床診断などへの応用が期待される。末梢神経系の刺激伝達物質の一つであるアセチルコリンは逆相系カラムで分離後、アセチルコリンエステラーゼ及びコリンオキシダーゼを固定化したカラムにより過酸化水素に変換して定量できる。コリンも同時に定量でき、定量範囲は注入量で10 pmol～10 nmolである¹⁴⁸⁾。L-アミノ酸オキシダーゼを固定化したカラムを用いて過酸化水素に変換することで $0.35 \times 10^{-6} \sim 3 \times 10^{-6}$ Mのアミノ酸を定量できる¹⁴⁹⁾。重要な生体成分であるコリン含有リン脂質の定量にHPLCとFIAを結びつけた方法が考案されている。リン脂質は脂溶性が高く、その分離には特殊なカラム(アミノプロピル修飾シリカゲルカラム)が必要である。種々のコリン含有リン脂質を分取後、減圧乾固する。残留物はTriton X-100水溶液に溶解し、ホスホリパーゼD及びコリンオキシダーゼを固定化したカラムを組み込んだFIA-化学発光検出で測定する。これによって、ヒト血清中のコリン含有リン脂質が測定できる¹⁵⁰⁾。また、がんのマーカーとして注目されているポリアミンの測定に、PO-CLが利用できる。ポリアミンを逆相系カラムで分離後、ポリアミンオキシダーゼとプトレッシンオキシダーゼのIMERを通し、生じる過酸化水素をDNPOと8-アニリノナフタレンスルホン酸を発光試薬として検出する。5 pmolのプトレッシンが精度良く検出できる¹⁵¹⁾。同じく、ポリアミン及びそのモノアセチル体は、HPLC分離後、アセチルポリアミンアミドヒドロラーゼとプトレッシンオキシダーゼを固定化したIMERを通し、TCPO-TMPをポストカラム発光試薬に用いて感度良く検出できる。ポリアミンが植物の膜安定化やラジカルの消去などの酸化防御作用に関連していることから、ジャガイモ中のポリアミンの測定に適用された¹⁵²⁾。バッチ法によりピルビン酸の定量が検討された。ピルビン酸オキシダーゼによりピルビン酸を過酸化水素に変換し検出するが、発光試薬にはTCPO-ペリレンが使用されている。本法では、 $1 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-2}$ Mの範囲で定量が可能であり、血清中のピルビン酸定量に適用できる¹⁵³⁾。

4.3.8 増感作用の利用, その他 PO-CLを化学発光イムノアッセイの検出手段に利用できる。酵素反応により生じる過酸化水素を検出して、 17α -ヒドロキシprogesteronやチロキシンなどが定量できる。写真法を利用して蛍光物質や過酸化水素を検出する方法が検討されている。

蛍光物質の検出はポラロイド写真を利用して、簡便に行うことができる。白黒写真上にスポットとして検出し、その大きさから半定量される。1,10-フェナントロリン-過酸化水素及びルミノール-過酸化水素系の化学発光を利用して、1,10-フェナントロリンや鉄錯体がそれぞれ 6×10^{-5} M及び 2×10^{-15} Mで検出されている¹⁵⁴⁾。ピリミド[5,4-d]ピリジン類やローダミンBなどの蛍光物質はカラスポットとして検出され、それらの増感作用が評価されている。更に、蛍光増感剤としてピリミド[5,4-d]ピリジン類を使用し、オキサミドには4,4'-オキサリル-ビス[(トリフルオロメチルスルホニル)イミノ]トリメチレン-ビス(4-メチルモルホリニウム)トリフルオロメタンスルホネートを用いる写真法は、ヒト血清中のグルコースの半定量に適用されている¹⁵⁵⁾。また、写真検出を利用した、抗ヒトT細胞白血病ウイルスI型抗体を検索するための化学発光免疫測定法が開発されている¹⁵⁶⁾。

その他、ポリアミンが本反応を触媒し、発光を増感することを利用した定量法が開発され、トマト中のポリアミンの定量に適用されている¹⁵⁷⁾。また、TDPOとスルホローダミンを発光試薬に用いるアミン類のFIAが開発され、55種のアミン類の検出が検討されている。脂肪族第一アミンは $\sim 1.2 \times 10^{-8}$ M、ポリアミンは $\sim 7 \times 10^{-10}$ Mの高感度な検出ができ、魚肉中のヒスタミン定量に適用されている¹⁵⁸⁾。一方、シュウ酸やボルフィリン類の定量にもPO-CL検出が適用できる¹⁵⁹⁾¹⁶⁰⁾。例えば、シュウ酸はエタノール中、過酸化水素、ビス(シクロヘキシル)カルボジイミド(DCC)及びジフェニルアントラセンを発光試薬とするpH1の反応で発光するため、これを定量に利用することができる。同じく血清中のシュウ酸の定量にも適用できる。また、ボルフィリン類はこのPO-CLを増感することが知られており、試薬にDCC及びシュウ酸カリウムを用いてボルフィリンによる増感を測定すれば、尿中のボルフィリンが定量できる。

CEの検出にPO-CLが利用されている。例えば、タンパク質のCE-PO-CLが検討され、UV検出よりも35倍高感度に検出できている¹⁶¹⁾。また、ウシ血清アルブミンがエオシンやローズベンガルなどの色素と複合体を形成し、CEで色素とともに移動することが見いだされた。そこで、この性質を利用して、これらの複合体を分離後PO-CL検出すると、 $5 \times 10^{-7} \sim 1 \times 10^{-4}$ Mのアルブミンが、検出下限 2×10^{-7} M (4 fmol)で定量できる¹⁶²⁾。その後、更に感度が改善され、1.7 fmolが検出できるようになっている¹⁶³⁾。CEはタンパク質の分離に向いており、高感度なPO-CL検出との組み合わせは、生体高分子の計測に有用な手段として、これから更に注目されるものと期待される¹⁶⁴⁾。

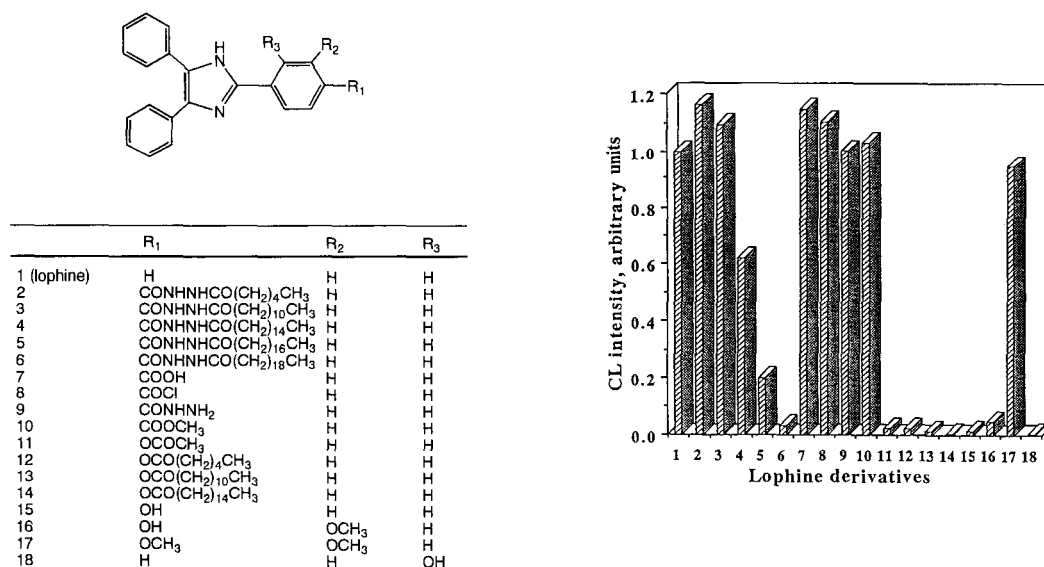


Fig. 18 Relative CL intensities of lophine derivatives

Number of x-axis correspond to the compound number. A relative CL intensity of lophine was arbitrarily taken as 1.

(Reproduced from ref. 166: *Anal. Chim. Acta*, **303**, 103 (1995) with permission from Elsevier Science)

4.4 ジオキセタン誘導体

ジオキセタン誘導体の中で、分析的には用いられているのは、アダマンチルジオキセタン誘導体である。1,2-ジオキセタン誘導体は熱分解により開裂し、2分子のカルボニル化合物となるが、このとき一方が励起され、これから発光が生じると考えられている。これまでに種々のジオキセタン誘導体が合成され、熱分解発光が検討されたが、アダマンチル-1,2-ジオキセタン誘導体は、化学的あるいは酵素的に分解されると効率良く発光を生じることが示された。例えば、アダマンチルメトキシフェニルホスホリルジオキセタン (AMPPD) はアルカリホスファターゼ (ALP) で分解されて発光するが、本反応を利用して、サブamolレベルのALPを超高感度に検出することができる¹⁶⁵⁾。AMPPDはALPを標識酵素に用いる全自動エンザイムイムノアッセイ装置で繁用され臨床検査に役立っている²⁷⁾。同じく、アダマンチルメトキシフェニル-β-D-ガラクトシルジオキセタン (AMPGD) はβ-D-ガラクトシダーゼ (β-Gal) により分解され発光する。本反応系を用いると、低amolレベルのβ-Galが検出可能である。更に、アダマンチルジオキセタンを発光体とする酵素基質として、β-グルクロニダーゼ、β-グルコシダーゼ、ホスホリパーゼに特異的なものが開発され、イムノアッセイ、プローブやレポータージーンアッセイなどに利用されている。アダマンチルジオキセタン誘導体の発光寿命は非常に長く、写真検出を利用する分析法に適している。

4.5 ロフィン及びインドール誘導体

ロフィンは120年以上も前に見いだされた化学発光物質であるが、発光機構や蛍光特性などの研究はあるものの分析化学的な応用研究は非常に少ない。ロフィンは塩基存在化、過酸化水素と反応して発光するが、コバルト(II)、塩素酸イオン、クロム(III)、銅(II)などのイオンがこの発光を増感する。したがって、発光の増感を計測することによりこれらのイオン濃度を定量することができる。いずれも $\sim 10^{-6}$ M程度が定量可能である。ロフィン誘導体-過酸化水素-コバルト(II)の発光系を塩酸ヒドロキシルアミンが増感することが見いだされ、FIAにより、18種の誘導体について発光増感が調べられた (Fig. 18)¹⁶⁷⁾。反応機構は解明されていないが、触媒するコバルトの触媒反応を増強し、ロフィンの酸化反応をより効率的にしているものと思われる。この現象を利用して、コバルト(II)の 4.5×10^{-8} Mの定量が可能である¹⁶⁷⁾。ロフィン誘導体は蛍光性の強い化合物であり、化学発光試薬よりはむしろ蛍光誘導体化試薬として覚せい剤や脂肪酸などの分析に利用されている。

インドール骨格はウミホタルルシフェリンの一部を構成しており、生物発光ともかかわりが深く、発光機構など様々な研究がなされている。しかし、ロフィン同様、分析化学的な応用研究は非常に少ない。インドール誘導体を発光体とするβ-Galの基質、インドキシルβ-D-ガラクトースが合成されている。アクリジンエステルなどの発光に比べ、インドール誘導体の発光は弱いですが、本基質の反応ではブラ

ンク値も小さく、したがって β -Gal として 3 amol まで検出できる¹⁶⁸⁾。

4・6 ルテニウム錯体

トリス(2,2'-ビピリジル)ルテニウム(II)錯体をポストカラム発光試薬に用いる HPLC-ECL 法は、高感度で選択的な計測法として知られている。ルテニウム錯体は約 450 nm に励起、620 nm に発光の蛍光波長を有する蛍光物質である。Fig. 3 に示したように、電極表面でルテニウム錯体及び共存する還元物質が酸化されると、還元物質から生じるラジカルがルテニウム錯体の酸化体を還元的に励起することで発光する。したがって、還元物質をあらかじめ HPLC で分離後、ルテニウム錯体とともに電極上で酸化させると発光を生じるので、これを検出すれば定量することができる。芳香族第三アミン類は発光しないが、脂肪族、特に脂環式第三アミンは強く発光するので、これらの分析に利用されている。脂肪族アミンとルテニウム錯体による発光の強度は第三アミン>第二アミン>第一アミンの順となる。したがって、第三アミンを有する薬剤の HPLC 定量に有用であり、抗ヒスタミン薬、抗コリン作用薬、エリスロマイシン及びその誘導体などに適用できる。また、第一アミンは第三アミンに変換後、高感度に HPLC-ECL 定量することができる。例えば、ジビニルスルホン (DVS) を第一アミンの環化付加反応に利用し、生成した DVS 誘導体を逆相系のカラムで分離後 ECL 検出すると、プロピルアミンや 3-アミノペンタンのそれぞれ 30 pmol 及び 1 pmol が検出可能である。一方、第一～第三アミンの同時定量では、これらを HPLC 分離後、アクリロニトリルをポストカラム試薬に用いて第一及び第二アミンを第三アミンとし、ECL 検出する¹⁶⁹⁾。インドール環を有する D- 及び L-トリプトファンは、リガンド交換 HPLC で分離後、ECL 検出され、いずれも注入量で 0.2 pmol ($S/N=2$) の感度で検出できる¹⁷⁰⁾。アミノ酸のダンシル誘導体もルテニウム錯体の ECL で検出でき、Dns-Glu の検出下限は 0.1 μ M (注入量で 2 pmol, $S/N=2$) である¹⁷¹⁾。ダンシル化しない場合に比べ、1000 倍の増感が得られる。尿や血液中のシュウ酸は逆相系イオン対カラムで分離後 ECL で検出・定量することができるが、試料を注入する前に、尿は汙過後希釈し、血漿は除タンパクしておく。本反応で、アミノ酸やインドール類は発光を妨害するが、HPLC 分離によりシュウ酸類を選択的に定量することができ、検出下限は 1 nmol/ml (注入量で 25 pmol) である。また、検量線の直線範囲は臨床検査に用いる尿及び血漿の濃度範囲を満足している¹⁷²⁾。ところで、装置の簡便化やポストカラム混和によるピークの広がりを是正するなどを目的に、ルテニウム錯体を移動相に直接添加する方法が検討されている。これによると、シュウ酸の検出下限は 0.1 μ M となり、ポス

トカラム法に比べかなり感度が改善された¹⁷³⁾。この手法は、尿及び血漿中のエリスロマイシンの ECL 検出で定量に生かされている。また、マイクロボアカラムを使用して更にピークの広がりを抑え、分離効率を増加させることで、エリスロマイシンの検出下限を注入量当たり 50 fmol ($S/N=3$) としている¹⁷⁴⁾。新規エリスロマイシン、ジ(*N*-メチル)-*N*-エチル-8,9-アンヒドロエリスロマイシン A 6,9-ヘミアセタール及びその 3 種の代謝物がエリスロマイシンを内標準として定量されている。血漿及び尿の定量に適用され、それぞれ 1 ng/ml 及び 10 ng/ml の定量下限が得られている¹⁷⁵⁾。除草剤のグリホサート及び構造類似化合物をイオン交換カラムで分離後、ECL 検出すると、グリシン<ジエタノールアミン<ヒドロキシエチルグリシン<イミノジ酢酸<グリホセートの順に発光が大きくなる。グリホサートの検出下限は 0.01 μ M である¹⁷⁶⁾。最近、アルカロイドのヨヒンビンが定量されている。イオン対 HPLC で分離後 ECL 検出するもので、ヒト血清中のヨヒンビンを 30 ng/ml ($S/N=3$) の感度で検出できる¹⁷⁷⁾。また、ラット尿中のフェンシクリジン及びその代謝物の計測にも HPLC-ECL が利用されている¹⁷⁸⁾。一方、ルテニウム錯体の配位子をビピリジンからオルトフェナントロリンに代えた、トリス(1,10-フェナントロリン)ルテニウム(II)錯体の ECL が報告され、お茶のシュウ酸定量に適用された¹⁷⁹⁾。酸化ルテニウム錯体に *N*-ヒドロキシスクシンイミドを導入した標識試薬は抗原や抗体あるいは核酸の標識に利用できるため、これらの電気化学発光イムノアッセイに利用されている。ルテニウム錯体を標識した抗体を用いる競合法によるホモジニアスなアッセイ系、微粒子を固相担体を利用するサンドイッチ法、磁石電極と磁性微粒子を組み合わせる反応物を電極面に集積して発光を行う方法など、種々の方法が開発された。なお、電気化学発光イムノアッセイは自動免疫測定装置として市販され、肝がんマーカーや感染症の臨床化学分析などに役立てられている¹⁸⁰⁾。

4・7 その他の応用分析

没食子酸 (gallic acid) の化学発光は古くから知られているが、その分析的な応用研究はほとんどなされていなかった。最近、ラジカルクエンチャーとして注目を集めているお茶に含まれるカテキン、(-)-エピガロカテキン 3-ガレートがアセトアルデヒド、西洋ワサビペルオキシダーゼ、及び過酸化水素との反応で発光することを利用した特異的な HPLC 定量法が開発された。ラット及びヒト血漿中のカテキンの定量に適用し、カテキン摂取後の血中濃度変化が測定された¹⁸¹⁾。また、ピロガロールも化学発光体であることが知られているが、このピロガロール構造単位を複数含む環状化合物、カリックス[4]アレン類が合成され、それらの化学発光特性が検討されている¹⁸²⁾。これからの分析的な応用研究への展開を期待したい。

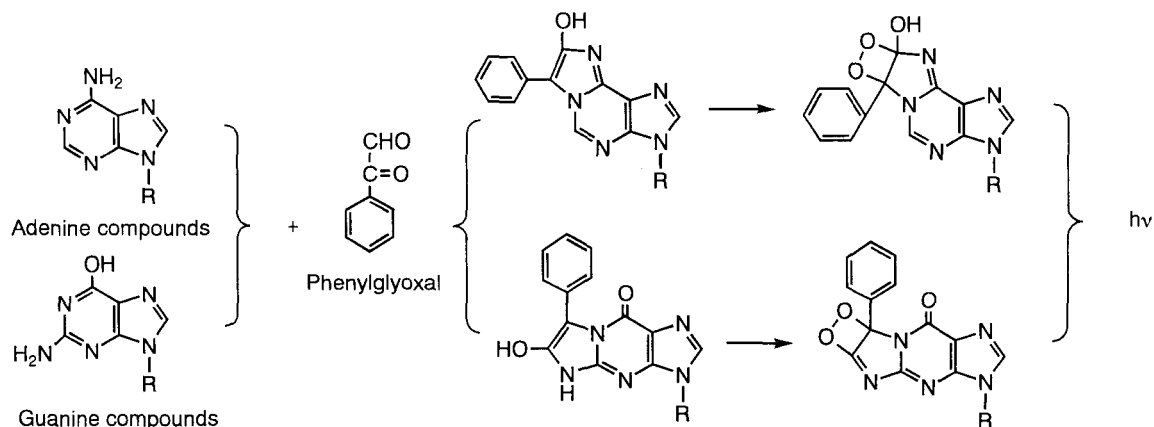


Fig. 19 Proposed CL reaction mechanism of adenine and guanine compounds with phenylglyoxal

20 年ほど前に、グアニジノ化合物と 9,10-フェナントレンキノンの反応で生じる発光がグアニジノ化合物の HPLC 化学発光検出に利用された。まず、グアニジノ化合物を陽イオン交換カラムで段階溶出し、次いで 0.03% 9,10-フェナントレンキノンジメチルホルムアミド溶液と 2 M 水酸化ナトリウム-30% ジメチルスルホキシド水溶液を反応コイル中 55°C で反応させ、生じる発光を検出する¹⁸³⁾。その後、アデニンとそれらのヌクレオシドやヌクレオチド¹⁸⁴⁾¹⁸⁵⁾、あるいはグアニンとそれらのヌクレオシドやヌクレオチド¹⁸⁶⁾がグリオキサール誘導体と反応して、化学発光性の誘導体を生じることが明らかにされた。発光反応機構は完全に解明されていないが、Fig. 19 に示す反応スキームが推定されている。生じた誘導体は塩基性下、ジメチルホルムアミドなどの非プロトン性有機溶媒中で強く発光する。例えば、アデニル化合物とジメチルグリオキサールジメチルアセタールはヘテロポリ酸であるタングステイ酸及び 2-プロパノール存在下、化学発光性物質を与える。アデニンの場合、 3×10^{-8} M が検出可能であり、DNA の分析に適用した場合数 ng が検出できる¹⁸⁷⁾。一方、グアニンを含む化合物を逆相系カラムで分離後、本反応を利用すると、4~53 pmol/ml の感度で検出できる。例えば、グリオキサール誘導体の一つである 3',4',5'-トリメトキシフェニルグリオキサール (TMPG) は DNA やグアニンヌクレオチドと反応して、強い発光を生じる。そこで、ナイロンメンブラン上に吸着させた DNA の検出に TMPG を適用し、-25°C における発光を CCD カメラで検出したところ、zmol レベルが検出できている¹⁸⁸⁾。

一酸化窒素 (NO) の化学発光は NO とオゾンの反応で生じる励起状態の二酸化窒素が基底状態に戻る際に生じる、600~3200 nm 領域の発光である¹⁸⁹⁾。亜硝酸イオンをヨウ化カリウムで還元し、遊離する NO の化学発光を熱エネルギー分析計で検出することで、亜硝酸イオンを定量する方法が検討され、FIA や HPLC に適用された。保

存食肉、ヒトだ液、体液中の硝酸イオンの定量値を比色法と比較し、良好な一致を見るときともに、操作が簡便でしかも比色法の 200 倍の感度 (検出下限は 0.1 ng) を得ている¹⁹⁰⁾。同じく、農薬のグリホサートは *N*-ニトロソグリホサートにニトロソ化し、これを陰イオン交換カラムで分離、次いで脱ニトロソ化して生じる NO の発光を測定することで定量ができる。穀物中のグリホサートの残留濃度測定に適用できる¹⁹¹⁾。窒素の化学発光検出器を利用して、ペプチドの HPLC 検出が検討され、合成ペプチド製剤の純度検定に適用されている¹⁹²⁾。

アヘンアルカロイドのモルヒネは強力な鎮痛薬として知られているが、ポリリン酸酸性下 (pH 1~2) 過マンガン酸との反応で発光を生じる現象が見いだされ、これを利用して、モルヒネ誘導体の FIA や HPLC 分析が検討された。内標準に合成した *N*-エチルノルモルヒネを使用し、血液や尿中のモルヒネを固相抽出後、逆相系のスチレン-ジビニルベンゼンカラムで分離、過マンガン酸カリウム溶液と混合させて発光・検出する。検出下限は注入量で 0.5 ng であり、薬物をプレカラム誘導体化しないで定量できる点が特長である¹⁹³⁾。1,10-フェナントロリン-過酸化水素-銅 (II) による発光系を用いるタンパク質の定量法が検討されている。金属キレート親和性カラムの pH グラジエント溶離でウシ血清アルブミン、リゾチーム、ウシ血清 γ -グロブリンの標準混液が分離・検出されている。ウシ血清 γ -グロブリンの定量範囲は $1 \times 10^{-4} \sim 1 \times 10^{-1}$ g/l であり、UV 検出の 200 倍の感度を有している¹⁹⁴⁾。同じく、1,10-フェナントロリン-過酸化水素-銅 (II) 発光系と陰イオン交換カラムクロマトグラフィーを利用するタンパク質の定量が検討され、UV 検出ができないほどの希釈試料中のオプアルブミン-トリプシンインヒビターやウシ血清アルブミン-トリプシンインヒビターを検出できることが示されている¹⁹⁵⁾。

硫黄化合物の化学発光も良く知られている¹⁹⁶⁾。分析的

な応用研究として、最近、セリウム(IV)の酸化発光をキニーネがエンハンスする現象を利用した、チオプロニン及びその代謝物である2-メルカプトプロピオン酸のFIA定量が開発され、チオプロニンの薬物動態解析に適用された¹⁹⁷⁾。同じく、ローダミンBをエンハンサーとするカプトプリルやヒドロクロロチアジド製剤の分析にも適用されている¹⁹⁸⁾¹⁹⁹⁾。

5 おわりに

高精度な方法、高感度な方法、特異的(高選択的)な方法、簡便な方法、いずれも物質を計測する上で不可欠な方法である。これらのすべてを満足する方法は皆無であろうが、より多くのものを満足できる方法の開発が望まれるのもまた事実である。化学発光法は高感度化を目指して開発が進められてきた方法である。特異性(高選択性)を持たせるために酵素反応や免疫反応を組み込んだり、HPLCやCEなどの分離手段利用が図られた。また、簡便性を持たせるためにFIAや写真法と組み合わせられた。このような努力の積み重ねが、今日の化学発光法の隆盛を見ているのだと思う。高感度であることと、高精度であることは時として相いれないこともあるが、少しでも精度の高い方法を開発することが必要である。臨床検査の現場で、老人や乳幼児の採血する場合を考えても、採血量は少ないほうが良い。そのためには高感度な方法が必要である。分析対象、試料量などに応じて、最適な方法が採用されるべきである。最近、三次元蛍光検出器が市販されるようになり、クロマトグラム上のピークの同定がより正確にできるようになってきた。将来、三次元の化学発光検出器が利用できるようになれば、高感度に同定、定量が可能な分離計測が実現できるものと期待している。また、計測コストの削減、環境汚染への配慮などから計測システムのミニチュア化が図られ、LCやCEなどで徐々に達成されている。また、将来的にもこの傾向はますます進行するものと考ええる。反面、化学発光計測を支えている発光系については、新しい反応系や発光体が容易には見いだされていないのが現状である。分析化学者自らが試薬を開発することによって、新しい発光系が見いだされ、生命科学や環境科学をはじめとする広範な分野に応用され、分析化学の重要性が一層認識されていくことを願っている。

文 献

- 1) M. A. Deluca, W. D. McElroy (Ed.): "Bioluminescence and Chemiluminescence", (1981), (Academic Press, New York).
- 2) 今井一洋編: "生物発光と化学発光", (1989), (廣川書店).
- 3) K. Nakashima, K. Imai: "Molecular Luminescence Spectroscopy", Edited by S. G. Schulman, pp. 1 ~ 23 (1993), (John Wiley & Sons, Inc, New York).
- 4) N. Kuroda, K. Nakashima: "Modern Derivatization Methods", Edited by T. Toyo'oka, pp. 167 ~ 189 (1999), (John Wiley & Sons Ltd, New York).
- 5) K. Imai: *Methods Enzymol.*, **133**, 435 (1986).
- 6) A. Mayer, S. Neuenhofer: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **33**, 1044 (1994).
- 7) A. G. Hadd, J. W. Birks: *Chem. Anal. (N. Y.)*, **131**, 209 (1995).
- 8) H. A. H. Rongen, R. M. W. Hoetelmans, A. Bult, W. P. Van Bennekom: *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **12**, 433 (1994).
- 9) B. Radziszewski: *Chem. Ber.*, **10**, 70 (1877).
- 10) H. D. Albrecht: *Z. Phys. Chem.*, **136**, 321 (1928).
- 11) G. H. G. Thorpe, L. J. Kricka, E. Gillespie, S. Moseley, R. Amess, N. Baggett, T. P. Whitehead: *Anal. Biochem.*, **145**, 96 (1985).
- 12) K. Glue, W. Petsch: *Angew. Chem.*, **48**, 57 (1935).
- 13) E. A. Chandross: *Tetrahedron Lett.*, **1963**, 761.
- 14) M. M. Rauhut, D. Sheehan, R. A. Clarke, A. M. Semsel: *Photochem. Photobiol.*, **4**, 1097 (1965).
- 15) K. R. Kopecky, J. H. Van De Sande, C. Mumford: *Can. J. Chem.*, **46**, 25 (1968).
- 16) W. H. Richardson, M. B. Yelvington, H. E. O'Neal: *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 1619 (1972).
- 17) A. P. Schaap, R. S. Handley, B. P. Giri: *Tetrahedron Lett.*, **28**, 935 (1987).
- 18) I. Bronstein, B. Edward, J. C. Voyta: *J. Biolumin. Chemilumin.*, **4**, 99 (1989).
- 19) F. McCapra: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1968**, 155.
- 20) J. Y. Koo, G. B. Schuster: *J. Am. Chem. Soc.*, **99**, 6107 (1977).
- 21) I. Rubinstein, C. R. Martin, A. J. Bard: *Anal. Chem.*, **55**, 1580 (1983).
- 22) H. P. Chokshi, M. Barbush, R. G. Carlson, R. S. Givens, T. Kuwana, R. L. Schowen: *Biomed. Chromatogr.*, **4**, 96 (1990).
- 23) 中島憲一郎: *ぶんせき (Bunseki)*, **1996**, 518.
- 24) 中島憲一郎: *ぶんせき (Bunseki)*, **1994**, 263.
- 25) G. Lunn, L. C. Hellwig: "Handbook of Derivatization reactions for HPLC", (1998), (John Wiley & Sons, Inc., New York).
- 26) 大須賀慎二: *臨床検査*, **42**, 273 (1998).
- 27) 前川真人: *臨床検査*, **42**, 301 (1998).
- 28) C. Juana, S. Manuel, P-B. Dolores: *J. Chromatogr. A*, **749**, 73 (1996).
- 29) M. Sugiura, S. Kanda, K. Imai: *Biomed. Chromatogr.*, **7**, 149 (1993).
- 30) M. A. Ruberto, M. L. Grayesky: *Anal. Chem.*, **64**, 2758 (1992).
- 31) T. Hara, S. Kayama, H. Nishida, R. Nakajima: *Anal. Sci.*, **10**, 223 (1994).
- 32) R. Dadoo, A. G. Seto, L. A. Colon, R. N. Zare: *Anal. Chem.*, **66**, 303 (1994).
- 33) M. S. Gandelman, J. W. Birks: *J. Chromatogr.*, **242**, 21 (1982).
- 34) P. Jones, T. Williams, L. Ebdon: *Anal. Chim. Acta*, **217**, 157 (1989).
- 35) T. Hara, M. Toriyama, T. Ebuchi: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **58**, 109 (1985).
- 36) T. Miyazawa: *Free Radical Biol. Med.*, **7**, 209 (1989).
- 37) T. Miyazawa, K. Fujimoto, T. Suzuki, K. Yasuda: *Methods Enzymol.*, **233**, 324 (1994).
- 38) T. Miyazawa, K. Yasuda, K. Fujimoto, T. Kaneda:

- Anal. Lett.*, **21**, 1033 (1988).
- 39) T. Miyazawa, K. Fujimoto, S. Okikawa: *Biomed. Chromatogr.*, **4**, 131 (1990).
- 40) 河野善行, 阪本興彦, 富田健一, 堀井和泉, 宮沢陽夫: 油化学, **40**, 715 (1991).
- 41) T. Miyazawa, T. Suzuki, K. Fujimoto, K. Yasuda: *J. Lipid Res.*, **33**, 1051 (1992).
- 42) L. Cominacini, A. M. Pastorino, A. McCarthy, M. Campagnol, U. Garbin, A. Davoli, A. DeSantis, V. LoCacio: *Biochim. Biophys. Acta*, **1165**, 279 (1993).
- 43) T. C. Christensen, G. Hoelmer: *J. Food Sci.*, **61**, 486 (1996).
- 44) M. Yasuda, S. Narita: *J. Chromatogr. B*, **693**, 211 (1997).
- 45) J. Adachi, M. Asano, T. Naito, Y. Ueno, Y. Tatsuno: *Lipids*, **33**, 1235 (1998).
- 46) G. T. Shwaery, J. M. Samii, B. Frei, J. F. Jr. Keaney: *Methods Enzymol.*, **300**, 51 (1999).
- 47) H. Kather, E. Wieland, W. Waas: *Anal. Biochem.*, **163**, 45 (1987).
- 48) K. Nakashima, N. Hayashida, S. Kawaguchi, S. Akiyama, Y. Tsukamoto, K. Imai: *Anal. Sci.*, **7**, 715 (1991).
- 49) P. J. Jr. Koerner, T. A. Nieman: *J. Chromatogr.*, **449**, 217 (1988).
- 50) K. Sasamoto, Y. Ohkura: *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 1323 (1990).
- 51) J. A. Matthews, A. Batki, C. Hynds, L. J. Kricka: *Anal. Biochem.*, **151**, 205 (1985).
- 52) T. Segawa, T. Kamidate, H. Watanabe: *Anal. Sci.*, **4**, 659 (1988).
- 53) T. Stone, I. Durrant: *Mol. Biotechnol.*, **6**, 69 (1996).
- 54) J. Stevens, F. S. Yu, P. M. Hassoun, J. J. Lanzillo: *Mol. Cell. Prob.*, **10**, 31 (1996).
- 55) S. Ikegawa, N. Hirabayashi, T. Yoshimura, M. Tohma, M. Maeda, A. Tsuji: *J. Chromatogr.*, **577**, 229 (1992).
- 56) H. R. Schroeder, F. M. Yeager: *Anal. Chem.*, **50**, 1114 (1978).
- 57) H. Yuki, Y. Azuma, N. Maeda, H. Kawasaki: *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 1905 (1988).
- 58) 柄谷 肇, 高野純志, 森下伸吾, 吉田益子, 佐藤昌憲: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **38**, 59 (1989).
- 59) T. Kawasaki, M. Maeda, A. Tsuji: *J. Chromatogr.*, **328**, 121 (1985).
- 60) K. Nakashima, K. Suetsugu, S. Akiyama, M. Yosida: *J. Chromatogr.*, **530**, 154 (1990).
- 61) Y. Hasegawa, D. C. Jette, A. Miyamoto, H. Kawasaki, H. Yuki: *Anal. Sci.*, **7**, 945 (1991).
- 62) S. R. Spurlin, M. M. Cooper: *Anal. Lett.*, **19**, 2277 (1986).
- 63) J. Ishida, N. Horike, M. Yamaguchi: *J. Chromatogr. B*, **669**, 390 (1995).
- 64) J. Ishida, N. Horie, M. Yamaguchi: *Anal. Chim. Acta*, **302**, 61 (1995).
- 65) J. Ishida, T. Yakabe, H. Nohta, M. Yamaguchi: *Anal. Chim. Acta*, **346**, 175 (1997).
- 66) T. Nakahara, J. Ishida, M. Yamaguchi, M. Nakamura: *Anal. Biochem.*, **190**, 309 (1990).
- 67) J. Ishida, T. Nakahara, M. Yamaguchi: *Biomed. Chromatogr.*, **6**, 135 (1992).
- 68) J. Ishida, S. Sonezaki, M. Yamaguchi: *J. Chromatogr.*, **598**, 203 (1992).
- 69) J. Ishida, S. Sonezaki, M. Yamaguchi, T. Yoshitake: *Analyst* (London), **117**, 1719 (1992).
- 70) J. Ishida, S. Sonezaki, M. Yamaguchi, T. Yoshitake: *Anal. Sci.*, **9**, 319 (1993).
- 71) G. H. G. Thorpe, L. J. Kricka: *Methods Enzymol.*, **133**, 331 (1986).
- 72) T. P. Whitehead, G. H. G. Thorpe, T. J. N. Carter, C. Croucutt, L. J. Kricka: *Nature* (London), **305**, 158 (1983).
- 73) G. H. G. Thorpe, L. J. Kricka, E. Gillespie, S. Moseley, R. Amess, N. Baggett, T. P. Whitehead: *Anal. Biochem.*, **145**, 96 (1985).
- 74) L. J. Kricka, X. Jin: *J. Biolumin. Chemilumin.*, **10**, 49 (1995).
- 75) L. J. Kricka, M. Cooper, X. Jin: *Anal. Biochem.*, **240**, 119 (1996).
- 76) H. Arakawa, M. Maeda, A. Tsuji: *Anal. Biochem.*, **199**, 238 (1991).
- 77) L. L. Klopff, T. A. Nieman: *Anal. Chem.*, **57**, 46 (1985).
- 78) M. Maeda, A. Tsuji: *J. Chromatogr.*, **352**, 213 (1986).
- 79) T. Kamidate, K. Yoshida, T. Segawa, H. Watanabe: *Anal. Sci.*, **5**, 359 (1989).
- 80) N. C. Nelson, A. B. Cheikh, E. Matsuda, M. M. Becker: *Biochem.*, **35**, 8429 (1996).
- 81) N. Sato, K. Shirakawa, Y. Kakiyama, H. Mochizuki, T. Kanamori: *Anal. Sci.*, **12**, 853 (1996).
- 82) 中井利明, 磯部和正: 臨床検査, **42**, 283 (1998).
- 83) T. J. Novak, M. L. Grayeski: *Microchem. J.*, **50**, 151 (1994).
- 84) G. L. De Jong, N. Lammers, F. J. Spruit, U. A. T. Brinkman, R. W. Frei: *Chromatographia*, **18**, 129 (1984).
- 85) N. Hanaoka, R. S. Givens, R. L. Schowen, T. Kuwana: *Anal. Chem.*, **60**, 2193 (1988).
- 86) A. Nishitani, Y. Tsukamoto, S. Kanda, K. Imai: *Anal. Chim. Acta*, **251**, 247 (1991).
- 87) B. Mann, M. L. Grayeski: *Biomed. Chromatogr.*, **5**, 47 (1991).
- 88) M. Maeda, K. Tsukagoshi, M. Murata, M. Takagi: *Anal. Sci.*, **10**, 583 (1994).
- 89) K. Hayakawa, N. Terai, P. G. Dinning, K. Akutsu, Y. Iwamoto, R. Etoh, T. Murahashi: *Biomed. Chromatogr.*, **7**, 262 (1993).
- 90) K. Hayakawa, M. Butoh, Y. Hirabayashi, M. Miyazaki: *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, **40**, 20 (1994).
- 91) 村橋 毅, 早川和一, 岩本侑子, 宮崎元一: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **43**, 1017 (1994).
- 92) H. Li, R. Westerholm: *J. Chromatogr. A*, **664**, 177 (1994).
- 93) K. Hayakawa, N. Terai, P. G. Dinning, K. Akutsu, Y. Iwamoto, R. Etoh, T. Murahashi: *Biomed. Chromatogr.*, **7**, 262 (1993).
- 94) T. Murahashi, K. Hayakawa: *Anal. Chim. Acta*, **343**, 251 (1997).
- 95) N. Imaizumi, K. Hayakawa, Y. Suzuki, M. Miyazaki: *Biomed. Chromatogr.*, **4**, 108 (1990).
- 96) K. Kimoto, R. Gohda, K. Murayama, T. Santa, T. Fukushima, H. Homma, K. Imai: *Biomed. Chromatogr.*, **10**, 189 (1996).
- 97) T. G. Curtis, W. Seitz: *J. Chromatogr.*, **134**, 343 (1977).
- 98) G. Mellbin, B. E. F. Smith: *J. Chromatogr.*, **312**, 203 (1984).
- 99) S. Kobayashi, K. Imai: *Anal. Chem.*, **52**, 424 (1980).

- 100) K. Miyaguchi, K. Honda, K. Imai: *J. Chromatogr.*, **303**, 173 (1984).
- 101) K. Miyaguchi, K. Honda, K. Imai: *J. Chromatogr.*, **316**, 501 (1984).
- 102) K. Miyaguchi, K. Honda, T. Yoyo'oka, K. Imai: *J. Chromatogr.*, **352**, 255 (1986).
- 103) K. Hayakawa, N. Imaizumi, H. Ishikura, M. Hiromi, E. Minogawa, N. Takayama, H. Kobayashi, M. Miyazaki: *J. Chromatogr.*, **515**, 459 (1990).
- 104) K. Hayakawa, Y. Miyoshi, H. Kurimoto, Y. Matsushima, N. Takayama, S. Tanaka, M. Miyazaki: *Biol. Pharm. Bull.*, **16**, 817 (1993).
- 105) N. Takayama, S. Tanaka, K. Hayakawa: *Biomed. Chromatogr.*, **11**, 25 (1997).
- 106) A. Nishitani, S. Kanda, K. Imai: *Biomed. Chromatogr.*, **6**, 124 (1992).
- 107) S. Kobayashi, J. Sekino, K. Honda, K. Imai: *Anal. Biochem.*, **112**, 99 (1981).
- 108) D. L. Walters, J. E. James, F. B. Vest, H. T. Karnes: *Biomed. Chromatogr.*, **8**, 207 (1994).
- 109) C-E, Tsai, F. Kondo, Y. Ueyama, J. Azama: *J. Chromatogr. Sci.*, **33**, 365 (1995).
- 110) K. Nakashima, K. Suetsugu, K. Yoshida, S. Akiyama, S. Uzu, K. Imai: *Biomed. Chromatogr.*, **6**, 149 (1992).
- 111) 佐藤健二, 大竹淳一, 田中誠之: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **46**, 991 (1997).
- 112) S. Uzu, K. Imai, K. Nakashima, S. Akiyama: *Analyst* (London), **116**, 1353 (1991).
- 113) P. de Montigny, F. Stobaugh, R. S. Givens, R. G. Carlson, K. Srinivasacher, L. A. Sternson, T. Higuchi: *Anal. Chem.*, **59**, 1096 (1987).
- 114) T. Kawasaki, K. Imai, T. Higuchi, O. S. Wong: *Biomed. Chromatogr.*, **4**, 113 (1990).
- 115) P. J. M. Kwakman, H. Koelewijn, I. Kool, U. A. Th. Brinkman, G. J. de Jong: *J. Chromatogr.*, **511**, 155 (1990).
- 116) S. Higashidate, K. Imai: *Analyst* (London), **117**, 1863 (1992).
- 117) P. Prados, S. Higashidate, K. Imai: *Biomed. Chromatogr.*, **8**, 1 (1994).
- 118) P. Prados, S. Higashidate, K. Imai, Y. Sato, T. Nagao: *Biomed. Chromatogr.*, **8**, 49 (1994).
- 119) G. H. Ragab, H. Nohta, M. Kai, Y. Ohkura, K. Zaitzu: *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **13**, 645 (1995).
- 120) H. Kouwatli, J. Chalom, M. Tod, R. Farinotti, G. Mahuzier: *Anal. Chim. Acta*, **266**, 243 (1992).
- 121) K. Imai, S. Higashidate, A. Nishitani, Y. Tsukamoto, M. Ishibashi, J. Shoda, T. Osuga: *Anal. Chim. Acta*, **227**, 21 (1989).
- 122) S. Higashidate, K. Hibi, M. Senda, S. Kanda, K. Imai: *J. Chromatogr.*, **515**, 577 (1990).
- 123) H. Akiyama, T. Toida, T. Imanari: *Anal. Sci.*, **7**, 807 (1991).
- 124) H. Akiyama, S. Shidawara, A. Maeda, H. Toyoda, T. Toida, T. Imanari: *J. Chromatogr.*, **579**, 203 (1992).
- 125) L. Nondek, R. E. Milofsky, J. W. Birks: *Chromatographia*, **32**, 33 (1991).
- 126) S. Uzu, K. Imai, K. Nakashima, S. Akiyama: *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **10**, 979 (1992).
- 127) Y. Hamachi, M. N. Nakashima, K. Nakashima: *J. Chromatogr. B*, **724**, 189 (1999).
- 128) B. Mann, M. L. Grayesky: *J. Chromatogr.*, **386**, 149 (1987).
- 129) K. Nakashima, M. Nagata, M. Takahashi, S. Akiyama: *Biomed. Chromatogr.*, **6**, 55 (1992).
- 130) M. L. Grayeski, J. K. De Vasto: *Anal. Chem.*, **59**, 1203 (1987).
- 131) P. J. M. Kwakman, H. P. Van Schaik, U. A. T. Brinkman, G. J. De Jong: *Analyst* (London), **116**, 1385 (1991).
- 132) B. W. Sandmann, M. L. Grayeski: *J. Chromatogr. B*, **653**, 123 (1994).
- 133) G-L. Duan, K. Nakashima, N. Kuroda, S. Akiyama: *J. Chin. Pharm. Sci.*, **4**, 22 (1995).
- 134) M. L. Grayeski, J. K. DeVasto: *Anal. Chem.*, **59**, 1203 (1987).
- 135) M. Tod, M. Prevot, J. Chalom, R. Farinotti, G. Mahuzier: *J. Chromatogr.*, **542**, 295 (1991).
- 136) K. Nakashima, C. Umekawa S. Nakatsuji, S. Akiyama, R. S. Givens: *Biomed. Chromatogr.*, **3**, 39 (1989).
- 137) O. Nozaki, Y. Ohba, K. Imai: *Anal. Chim. Acta*, **205**, 255 (1988).
- 138) P. J. M. Kwakman, J. G. J. Mol, D. A. Kamminga, R. W. Frei, U. A. Th. Brinkman, G. J. de Jong: *J. Chromatogr.*, **459**, 139 (1988).
- 139) S. Yoshida, K. Urakami, M. Kito, S. Takeshima, S. Hirose: *J. Chromatogr.*, **530**, 57 (1990).
- 140) S. Yoshida, K. Urakami, M. Kito, S. Takeshima, S. Hirose: *Anal. Chim. Acta*, **239**, 181 (1990).
- 141) K. Sato, S. Tanaka: *Microchem. J.*, **53**, 93 (1996).
- 142) K. Nakashima, K. Maki, S. Akiyama, K. Imai: *Biomed. Chromatogr.*, **4**, 105 (1990).
- 143) K. Nakashima, K. Maki, S. Kawaguchi, S. Akiyama, Y. Tsukamoto, K. Imai: *Anal. Sci.*, **7**, 709 (1991).
- 144) K. Nakashima, M. Wada, N. Kuroda, S. Akiyama, K. Imai: *J. Liq. Chromatogr.*, **17**, 2111 (1994).
- 145) M. Katayama, H. Takeuchi, H. Taniguchi: *Anal. Lett.*, **24**, 1005 (1991).
- 146) G. Gubitz, P. Zoonen, C. Goojer, N. H. Velthorst, R. W. Frei: *Anal. Chem.*, **57**, 2071 (1985).
- 147) H. Jansen, U. A. T. Brinkman, R. W. Frei: *J. Chromatogr.*, **440**, 217 (1988).
- 148) K. Honda, K. Miyaguchi, H. Nishino, H. Tanaka, Y. Yao, K. Imai: *Anal. Biochem.*, **153**, 50 (1986).
- 149) H. Jansen, U. A. Th. Brikman. R. W. Frei: *J. Chromatogr.*, **40**, 217 (1988).
- 150) M. Wada, K. Nakashima, N. Kuroda, S. Akiyama, K. Imai: *J. Chromatogr. B*, **678**, 129 (1996).
- 151) S. Kamei, A. Ohtsubo, S. Saito, S. Takagi: *Anal. Chem.*, **61**, 1921 (1989).
- 152) M. Wada, N. Kuroda, T. Ikenaga, S. Akiyama, K. Nakashima: *Anal. Sci.*, **12**, 807 (1996).
- 153) 上館民夫, 奥山真人, 瀬川 規, 渡辺寛人: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **40**, 65 (1991).
- 154) K. Ueno, F. Sagara, I. Yoshida, H. Enami, S. Etoh, H. Miyazaki, A. Sonoda, M. Saito: *Anal. Sci.*, **4**, 477 (1988).
- 155) K. Nakashima, S. Kawaguchi, R. S. Givens, S. Akiyama: *Anal. Sci.*, **6**, 833 (1990).
- 156) N. Kuroda, S. Hosoki, K. Nakashima, S. Akiyama, R. S. Givens: *J. Biolumin. Chemilumin.*, **13**, 101 (1998).
- 157) M. Katayama: *Meiji Yakka Daigaku Kenkyu Kiyo*, **24**, 43 (1994).
- 158) M. Katayama, H. Takeuchi, H. Taniguchi: *Anal. Chim. Acta*, **281**, 111 (1993).
- 159) S. Albrecht, H. Brandl, W. D. Bohm, R. Beckert, H. Kroschwitz, V. Neumeister: *Anal. Chim. Acta*, **255**, 413 (1991).

- 160) S. Albrecht, H. Hornak, T. Freidt, W. D. Bohm, K. Weis, A. Reinschke: *J. Biol. Chem.*, **8**, 21 (1993).
- 161) N. Wu, C. W. Huie: *J. Chromatogr.*, **634**, 309 (1993).
- 162) T. Hara, J. Yokogi, S. Okamura, S. Kato, R. Nakajima: *J. Chromatogr.*, **652**, 361 (1993).
- 163) T. Hara, S. Kayama, H. Nishida, R. Nakajima: *Anal. Sci.*, **10**, 223 (1994).
- 164) W. R. G. Baeyens, B. L. Ling, K. Imai, A. C. Calokrinis, S. G. Schulman: *J. Microcol. Sep.*, **6**, 195 (1994).
- 165) L. J. Kricka: *Clin. Chem.*, **37**, 1472 (1991).
- 166) K. Nakashima, H. Yamasaki, N. Kuroda, S. Akiyama: *Anal. Chim. Acta*, **303**, 103 (1995).
- 167) K. Nakashima, H. Yamasaki, R. Shimoda, N. Kuroda, S. Akiyama, W. R. G. Baeyens: *Biomed. Chromatogr.*, **11**, 63 (1997).
- 168) 前田昌子: 臨床検査, **42**, 263 (1998).
- 169) S. Yamazaki, R. Chiba, K. Uchikura, T. Tanimura: *Chromatography*, **16**, 322 (1995).
- 170) K. Uchikura, M. Kurisawa: *Anal. Sci.*, **7**, 971 (1991).
- 171) W-Y. Lee, T. A. Nieman: *J. Chromatogr. A*, **659**, 111 (1994).
- 172) D. R. Skottky, T. A. Nieman: *J. Chromatogr. B*, **665**, 27 (1995).
- 173) D. R. Skottky, W-Y. Lee, T. A. Nieman: *Anal. Chem.*, **68**, 1530 (1996).
- 174) J. S. Ridlen, D. R. Skottky, P. T. Kissinger, T. A. Nieman: *J. Chromatogr. B*, **694**, 394 (1997).
- 175) H. Monji, M. Yamaguchi, I. Aoki, H. Ueno: *J. Chromatogr. B*, **690**, 305 (1997).
- 176) J. S. Ridlen, G. J. Klopff, T. A. Nieman: *Anal. Chim. Acta*, **341**, 195 (1997).
- 177) R. Chiba, M. Shinriki, Y. Ishii, A. Tanaka: *Anal. Sci.*, **14**, 975 (1998).
- 178) R. Chiba, M. Fukushima, A. Tanaka: *Anal. Sci.*, **14**, 979 (1998).
- 179) F. Wu, Z. He, O. Luo, Y. Zeng: *Anal. Sci.*, **14**, 971 (1998).
- 180) 難波祐三郎, 金島才仁: 臨床検査, **42**, 293 (1998).
- 181) K. Nakagawa, T. Miyazawa: *Anal. Biochem.*, **248**, 41 (1997).
- 182) M. Nakazono, Y. Ohba, K. Zaitzu: *Chem. Pharm. Bull.*, **47**, 569 (1999).
- 183) I. Furukawa, H. Hosotsubo, C. Hayashi, Y. Ishida: *Jpn. J. Clin. Chem.*, **9**, 279 (1980).
- 184) N. Kuroda, K. Nakashima, S. Akiyama: *Anal. Chim. Acta*, **278**, 275 (1993).
- 185) N. Sato, K. Shirakawa, K. Sugihara, T. Kanamori: *Anal. Sci.*, **13**, 59 (1997).
- 186) M. Kai, Y. Ohkura, S. Yonekura, M. Iwasaki: *Anal. Chim. Acta*, **287**, 75 (1994).
- 187) N. Kuroda, K. Nakashima, S. Akiyama, N. Sato, N. Imi, K. Shirakawa, A. Uemura: *J. Biolumin. Chemilumin.*, **13**, 25 (1998).
- 188) M. Kai, S. Kishida, K. Sakai: *Anal. Chim. Acta*, **381**, 155 (1999).
- 189) A. J. Dunham, R. E. Sievers: *Chem. Anal. (N. Y.)*, **131**, 71 (1995).
- 190) N. P. Sen, P. A. Baddoo, S. W. Seaman: *J. Chromatogr. A*, **673**, 77 (1994).
- 191) N. P. Sen, P. A. Baddoo: *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, **63**, 107 (1996).
- 192) E. M. Fujinari, J. D. Manes, R. Bizanek: *J. Chromatogr. A*, **743**, 85 (1996).
- 193) R. W. Abbott, A. Townshend, R. Gill: *Analyst (London)*, **112**, 397 (1987).
- 194) T. Hara, K. Tsukagoshi, T. Yoshida: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **61**, 2779 (1988).
- 195) T. Hara, K. Tsukagoshi, H. Tsuji: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **63**, 770 (1990).
- 196) T. B. Ryerson, R. E. Sievers: *Chem. Anal. (N. Y.)*, **131**, 1 (1995).
- 197) Y. N. Zhao, W. R. G. Baeyens, X. R. Zhang, A. C. Calokrinis, K. Nakashima, G. Van der Weken, A. Van Overbeke: *Chromatographia*, **44**, 31 (1997).
- 198) X. R. Zhang, W. R. G. Baeyens, G. Van der Weken, A. C. Calokrinis, K. Nakashima: *Anal. Chim. Acta*, **303**, 121 (1995).
- 199) J. Ouyang, W. R. G. Baeyens, J. Delanghe, G. Van Der Weken, W. Van Dael, D. De Keukeleire, A. M. Garcia Campana: *Anal. Chim. Acta*, **386**, 257 (1999).

要 旨

化学反応の結果生じる発光を計測して、反応基質そのものや反応に関与する化合物を分析する化学発光計測法は、高感度で選択的な方法の一つとして良く知られている。特に、化学発光は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) やイムノアッセイの検出系に利用され、超高感度な分析法が開発されている。本論文では、化学発光の歴史について簡単に触れた後で、代表的な発光反応の機構や特性を概説し、化学発光計測を利用する分析法について HPLC などのフロー分析法への応用研究を中心に詳述した。応用研究については、化学発光試薬を詳述するとともに、化学発光計測の特長である高感度性を利用する生体成分などの微量物質の分析例を多数紹介した。また、新規な化学発光計測あるいは発光試薬を紹介し、それらの分析化学的な応用性について概説した。